

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580116

研究課題名(和文) 白麹菌の高クエン酸生産機構解明と有機酸高生産株の育種

研究課題名(英文) The mechanism of hyperproduction of citric acid by white koji mold, *Aspergillus kawachii* and application of production of organic acid

研究代表者

後藤 正利 (Goto, Masatoshi)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90274521

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：白麹菌によるクエン酸の高生産機構の解明を目指した。まず、白麹菌の高効率相同組換え株を開発した。白麹菌のクエン酸生産誘導条件下(低温培養移行)において発現量が変動したおよそ1,100の遺伝子を同定した。GO解析の結果から、糖化酵素の高分泌生産のための高温培養は白麹菌にとってストレスであり、細胞を熱ダメージから保護するため、熱ストレスへ対応していることがわかった。低温培養への移行により、グリセロールやトレハロースの合成系、ペントース経路の抑制に伴う代謝系の変換がクエン酸の高生産に関係しているものと推察された。また、クエン酸の高生産に重要と推定される遺伝子を選抜して、遺伝子破壊株を構築した。

研究成果の概要(英文)：We attempted to elucidate the mechanism for hyperproduction of citric acid by *Aspergillus kawachii*. A. *kawachii* ligD-disruptant which exhibits the ability of homologous recombination with high efficiency was constructed and auxotrophic strains were constructed. Approximately 1,100 genes that show differential expression after shifting cultivation at high temperature to cultivation at low temperature were identified. Gene ontology analysis revealed that A. *kawachii* is stressed from cultivation at high temperature that enhances the amylase activity and responds to protect against heat damage. Cultivation of A. *kawachii* at low temperature enhances production of citric acid. Under this condition EMP pathway to form pyruvate was reinforced by the repression of metabolic pathways for synthesis of glycerol and trehalose, and pentose phosphate in A. *kawachii*. Thirty six genes were selected to be important for high production of citric acid and 35 genes were disrupted in A. *kawachii*.

研究分野：応用微生物学

キーワード：Aspergillus 麹菌 有機酸発酵 ゲノム解析 マイクロアレイ解析

## 1. 研究開始当初の背景

我国の温暖な地域で製造される焼酎には、糖質分解酵素を高生産することに加え、製造時のもろみの pH を低く保ち雑菌の増殖を防ぐためにクエン酸を高生産する焼酎麹菌、黒麹菌 *A. awamori* あるいはその自然突然変異株である白麹菌 *A. kawachii* が用いられる。この焼酎麹菌によるクエン酸高生産性は、清酒製造に用いられる黄麹菌 *A. oryzae* には見られない性質であり、白麹菌を特徴づけている。一部の糸状菌が大量生産するクエン酸は、年間約 1400 万トン商品化されている。クエン酸は、黒アスペルギルス *A. niger*、*A. awamori* や *A. kawachii* によって大量につくられる。しかしながら、永年の研究にもかかわらずこれらのアスペルギルス属糸状菌がどのような遺伝子の働きによって、またどのような代謝経路の制御によってクエン酸を大量に生産するのか、そして類似の遺伝的背景を持つ黄麹菌などの菌では、なぜクエン酸が高生産されないのかの分子機構はほとんどわかっていない。

白麹菌 *A. kawachii* は、近年、その高いタンパク質及びクエン酸生産能力と安全性の観点から、異種タンパク質や有機酸の発現生産宿主としての利用も期待されている。しかし、*A. kawachii* は実用株であるため組換え DNA 実験に必要な栄養要求性の付与がされず、遺伝子工学的手法を用いた解析用宿主としての利用に制限がある。さらに、出芽酵母と比べ、活発に働く非同末端結合 (Non-Homologous End-Joining: NHEJ) 機構を有するために、遺伝子ターゲティングが困難であるという問題がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、我国の伝統的発酵食品製造に用いられる白麹菌 *A. kawachii* を特徴づけている性質の一つであるクエン酸の高生産機構の解明を目指す。特にオミックス解析を通して白麹菌のどの遺伝子の働きによってクエン酸が大量に生産されるのかを明らかにする。また、本研究目的を達成するために、*A. kawachii* の遺伝子工学的手法を用いた解析用宿主株を構築して利用する。さらに、有用有機酸であるイタコン酸を高生産する白麹菌の育種を試みる。

## 3. 研究の方法

### (1) 使用菌株及び使用培地

白麹菌 *A. kawachii* IF0 4308 を形質転換用宿主菌として使用した。焼酎製造用の *A. kawachii* SH46 ((株) 樋口松之助商店) をマイクロアレイ解析で使用した。白麹菌遺伝子破壊株の有機酸生産誘導培地として MOA 培地 (0.3%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.01%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.05 mg/l  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2.5 mg/l  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.6 mg/l  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、10% Glucose、pH4.0) を用いた。

### (2) 白麹菌の遺伝子工学実験

先に公開した *A. kawachii* のゲノム情報をもとにプライマーを作成し fusion PCR 法で、破壊遺伝子の 5' -非翻訳領域配列 (UTR)-選択マーカー遺伝子 (*pyrG* 遺伝子破壊の場合はマーカー遺伝子無し) -3' UTR からなる遺伝子破壊カセットを構築した。選択マーカー遺伝子として、ピリチアミン耐性遺伝子 *ptrA*、アルギニン合成に関与する ornithine carbamoyltransferase をコードする *argB* を用いた。*A. kawachii* の形質転換は、プロトプラスト-PEG 法により行った。選抜した形質転換体から genomic DNA を抽出し、PCR あるいはサザンブロット解析により、遺伝子破壊を確認した。

### (3) 麦麹の作成

*A. kawachii* SH46 を蒸した精麦大麦 (精麦歩合 70%、水分含量 35%) に接種した。アミラーゼ活性を誘導するために 25 時間までは 36 から 40°C で培養し、クエン酸を高生産させるために 26.5 時間後には 30°C へ培養温度を低下させ、44 時間まで培養した (通常製麹)。一方、上記製麹において接種後 26.5 時間、44 時間も 40°C のまま培養温度を維持した (高温製麹)。

### (4) 麦麹からの白麹菌 RNA の調製

凍結した麦麹を液体窒素存在下でハンマーを用いて破碎した。2 g の破碎された麦麹を 5 ml の RNAiso (Takara Bio) に懸濁して、時々激しく攪拌しながら 50°C で 10 分間処理した。5 分間室温で静置後、-80°C で 1 時間凍結させた。試料を室温で融解後、遠心分離した。上清をその 0.2 倍量のクロロホルムと混合し、激しく振とうした。遠心後、上澄みを SV Total RNA Isolation System (Promega) に供して、RNA の精製を行った。RNA の純度を BioAnalyzer Instrument (Agilent Technologies) にて確認した。

### (5) DNA マイクロアレイ解析

麦麹中での白麹菌遺伝子の発現解析を行うために、8x60K eArray (Agilent Technologies) を用いた。8x60K eArray には *A. kawachii* の 11,488 のコーディング配列 (CDS) が搭載されている。また、各 CDS につき、5 つの異なるプローブが結合するようにデザインされている。発現量の変動は、 $\log_2(\text{Fold Change})$  で表した。Limma package (<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/limma.html>) によって q 値が 0.01 以下で、 $\log_2(\text{Fold Change}) > 0.5$  を満たす場合に発現上昇、 $\log_2(\text{Fold Change}) < -0.5$  を満たす場合、発現減少とした。発現データは、*A. niger* の代謝経路モデルをもとに作成した *A. kawachii* の代謝経路モデルに当てはめた。また、Gene ontology (GO) 解析に用いた。*A. kawachii* の GO アノテーションは InterProScan に基づき行い、Perl script によって GO 解析を行った。マイクロアレイデータは Gene Expression Omnibus に GSE58454 として登録した。

### (6) 白麹菌破壊株の有機酸生産量測定

白麹菌を MOA 液体培地にて 30、160 rpm で 7 日間振とう培養した。培養上清を試料とした。試料を Acclaim OA カラムを備えた HPLC に供し、有機酸を定量した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 白麹菌の高効率相同組換え株の構築と栄養要求性株の取得。

白麹菌 *A. kawachii* は実用株で栄養要求性マーカーが付与されていない。また、相同組換え効率が低いため、遺伝子ターゲティングが困難である。そこで、白麹菌の非相同末端結合に関与する *ligD* 遺伝子の破壊株を構築した。得られた白麹菌 *ligD* 破壊株は各種寒天培地、30-40°C で野生株である *A. kawachii* IF0 4308 と同様の生育を示し、分生子形成能も野生株と同様であった。

*ligD* 破壊株を宿主としてアルギニン要求性株を取得するため *argB* を破壊した。この際に破壊ベクターの *argB* の上流、下流の相同配列部分の長さを変えたベクターを構築して、相同領域の長さと同組換え効率の関係について調べた。その結果、1.5 kb の相同領域を利用した場合は、野生株では *argB* 破壊株が取得されないのに対して、*ligD* 破壊株を宿主とした場合には形質転換体中 100% の割合で目的の *argB* 破壊株が取得できた。*ligD* 破壊株では、1.0 kb の相同領域を利用した場合に 65%、0.5 kb では 6% の割合で *argB* 破壊株が取得された。この実験によって *ligD* 破壊背景のアルギニン要求性株が取得できた。また、*ligD* 破壊株を用いる事で、ウリジン要求性になる *pyrG* 遺伝子破壊株やメチオニンを要求する ATP スルフィラーゼ *sC* 破壊株も構築できた。これらの白麹菌の宿主菌は、クエン酸高生産に関与する遺伝子の同定のための破壊株作成に利用した。

##### (2) 白麹菌と黄麹菌のゲノムの相違

クエン酸を高生産する白麹菌及び *A. niger* と、高生産しない黄麹菌の 3 菌株間で相同性 70% 以上を示す遺伝子数を調べた。3 菌株間で共通に保存された遺伝子数は 3,797 存在するが、クエン酸高生産株間で保存されかつ黄麹菌では保存されていない遺伝子数が 4,852 存在した。これらの 4,852 遺伝子のうち、クエン酸が合成される TCA 回路での代謝に関与すると推定される遺伝子は 4 つ存在し、細胞質リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (AKAW\_04056)、ミトコンドリアピルビン酸カルボキシラーゼ (AKAW\_08633) 2 種のクエン酸シンターゼ (AKAW\_00170、AKAW\_09689) であった。

*A. niger* の液体培養でのクエン酸生産に

関する報告では、クエン酸高生産の要因としてミトコンドリアでの有機酸の輸送系が関与しているのではないかと推定されている (W.A. de Jongh & J. Nielsen. *Metab. Eng.* 2008)。なかでも、細胞質のリンゴ酸をミトコンドリアに取り込み、同時にミトコンドリア中のクエン酸を細胞質に対向輸送するクエン酸/リンゴ酸キャリアー (CMC) はクエン酸の培地中への排出に重要な鍵をにぎっているのではないかと予想されている。上記代謝酵素遺伝子と同様に、ミトコンドリア局在性輸送体をコードする遺伝子のうちクエン酸高生産菌間で特に保存されたものには、6 つの遺伝子が該当した。推定クエン酸リンゴ酸トリカルボン酸輸送タンパク質 (AKAW\_10240) 3 つの推定ミトコンドリア輸送タンパク質 (AKAW\_00314、AKAW\_05736、AKAW\_07681) 2 つの推定 C<sub>4</sub>-ジカルボン酸/リンゴ酸トランスポーター (AKAW\_02799、AKAW\_07440) をコードする遺伝子であった。

##### (3) 麦麹のマイクロアレイ解析によるクエン酸高生産要因の探索

白麹菌を固体培養した麹でのクエン酸生産は、白麹菌自身が生産したアミラーゼによって原料のデンプンを分解して生じるグルコースの一部を利用してクエン酸を生産するものである。麦麹中の白麹菌全遺伝子の転写量をマイクロアレイで推定して、通常製麹サンプルと高温製麹サンプル間の同培養時間における発現変動遺伝子を抽出した。培養温度低下によるクエン酸生産誘導条件下において発現量が上昇した 566 遺伝子および低下した 548 遺伝子を同定した。発現変動した遺伝子についてジーンオントロジー (GO) 解析を行ったところ、発現変動遺伝子群は GO の Biological Process において 42 の GO term に濃縮されていた。それらは主に、EMP 経路、TCA 回路、ペントースリン酸経路、グリセロール経路、トレハロース経路などに含まれる。また、amino acid transport において、17 の発現上昇した遺伝子群が濃縮されていた。一方、Protein folding において 12 の発現減少した遺伝子群が濃縮されていた。GO 解析による発現変動遺伝子全体の挙動から、糖化酵素の分泌生産を促すための高温培養は白麹菌にとってストレスであり、細胞をダメージから保護するため、タンパク質の折りたたみに関する機能、ストレス保護剤として働くトレハロースやグリセロール生産の活性化が生じていることがわかった。低温培養への移行により、それら活性化した代謝系の抑制に伴う代謝系の変換がクエン酸の高生産に関係しているものと推察された (図 1)。

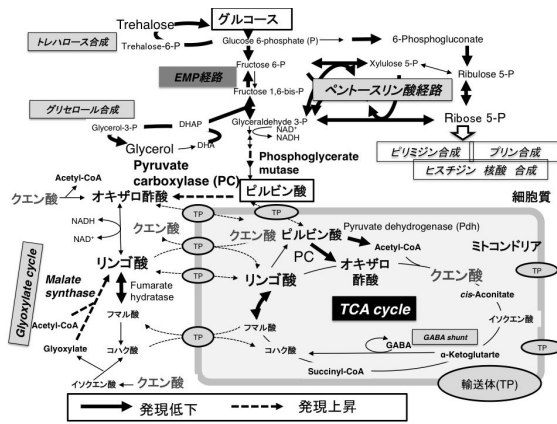


図 1. 温度低下に伴って発現変動した代謝酵素遺伝子

麦麹でのクエン酸生産誘導時におけるグルコースからピルビン酸までの解糖系、TCA 回路にかかわる個々の遺伝子の発現変動を調べた。解糖系ではクエン酸高生産時ににおいて全体的には遺伝子の大きな発現変動は認められなかったが、一部グリセロール 3-リン酸デヒドロゲナーゼ (AKAW\_10295) が 1/10 に発現減少し、ホスホグリセレート ムターゼの一つ (AKAW\_03245) が 2.2 倍発現上昇していた。細胞質の還元的 TCA 回路の一部であるピルビン酸からオキザロ酢酸への変換に 関与するピルビン酸カルボキシラーゼ (AKAW\_00804) の発現量が上昇していた。ミトコンドリア中の TCA 回路においては、逆にピルビン酸カルボキシラーゼやピルビン酸デヒドロゲナーゼの発現量が減少していた。グリオキサール酸経路のイソクエン酸から生成したグリオキサール酸をリンゴ酸に代謝するリンゴ酸合成酵素 (AKAW\_08716) で 2.8 倍の発現上昇が認められた (図 1)。

ついで、ミトコンドリアに局在する推定輸送体タンパク質をコードする遺伝子についての発現変動を調べた。麦麹中での白麹菌のクエン酸生産誘導後に発現上昇する遺伝子として、推定ジカルボン酸輸送体 (AKAW\_02096、AKAW\_02799、AKAW\_05361)、推定コハク酸-フマル酸輸送体 (AKAW\_09113)、推定トリカルボン酸輸送体 (AKAW\_03754)、6 種の推定輸送タンパク質 (AKAW\_00314、AKAW\_04250、AKAW\_04269、AKAW\_08131、AKAW\_09097、AKAW\_09662) をコードする遺伝子が見いだされた。クエン酸はミトコンドリア内で合成され最終的に白麹菌の細胞外へ排出される。ミトコンドリア内での TCA 回路を構成する代謝酵素遺伝子については発現変動が少なく、むしろミトコンドリア局在の輸送体遺伝子の発現変動が多いことは、白麹菌によるクエン酸の高生産においては、ミトコンドリアの輸送体が律速になっている可能性を示唆した。

(4) 白麹菌のクエン酸高生産に 関与する遺伝子の選抜と破壊。

上記、白麹菌と黄麹菌のゲノム比較の結果、

及びマイクロアレイ解析の結果、既報の細胞膜有機酸輸送体情報を考慮して、破壊を行う遺伝子を選抜した。表 1 に示す 36 遺伝子を破壊対象とした。推定細胞質局在ピルビン酸カルボキシラーゼをコードする AKAW\_00804 はホモカリオン体としての破壊株は取得できていないが、他の 35 遺伝子については、ホモカリオン破壊株が構築できた。

表 1. 遺伝子破壊対象の選抜

機能成分分類	#	Locus tag	推定機能	選抜方法
ミトコンドリア局在輸送体	1	AKAW_03754	tricarboxylate transporter (Ctp)	Microarray
	2	AKAW_04269	glutamate uniporter/aspartate-glutamate exchanger	Microarray
	3	AKAW_02096	dicarboxylate carrier protein	Microarray
	4	AKAW_09113	succinate:fumarate antiporter	Microarray
	5	AKAW_09662	calcium dependent carrier protein, putative	Microarray
	6	AKAW_04250	carrier protein, putative	Microarray
	7	AKAW_08131	carrier protein, putative, YMC1	Microarray
	8	AKAW_09097	carrier protein LEU5	Microarray
	9	AKAW_05213	mitochondrial carrier protein	Microarray
	10	AKAW_05361	C4-dicarboxylate/malic acid transporter	Microarray
	11	AKAW_00314	carrier protein, putative	Microarray, Genome
	12	AKAW_02799	C4-dicarboxylate/malic acid transporter	Genome
	13	AKAW_07440	C4-dicarboxylate/malic acid transporter	Genome
	14	AKAW_05736	mitochondrial carrier protein, putative	Genome
代謝酵素	1	AKAW_00804	cytoplasmic pyruvate carboxylase	Microarray
	3	AKAW_08716	malate synthase	Microarray
	4	AKAW_03245	phosphoglycerate mutase	Microarray
	5	AKAW_04056	cytoplasmic malate dehydrogenase	Genome
	6	AKAW_08633	mitochondrial pyruvate carboxylase	Genome
	7	AKAW_00170	citrate synthase	Genome
	転写因子	1	AKAW_03658	RosA (Regulator of sexual development)
2		AKAW_09811	NosA (Number of sexual spores)	Microarray
3		AKAW_02903	Zn(II)2Cys6 transcription factor	Microarray
4		AKAW_09548	bZIP transcription factor	Microarray
5		AKAW_06968	bZIP transcription factor	Microarray
6		AKAW_02766	C6 transcription factor	Microarray
7		AKAW_01957	C6 transcription factor	Microarray
8		AKAW_02165	Rtg2 transcription factor	Report
機能未知	1	AKAW_05814	hypothetical protein	Microarray
	2	AKAW_05924	similar to An12g09920	Microarray
	3	AKAW_11338	hypothetical protein	Microarray
細胞膜局在輸送体	1	AKAW_07940	Bestrohpin, BEST1	Report
	2	AKAW_08833	Bestrohpin, BEST1	Report
	3	AKAW_01155	MATE efflux family protein subfamily	Report
	4	AKAW_09570	MATE efflux family protein subfamily	Report

(5) 白麹菌遺伝子破壊株のクエン酸生産性 一部の破壊株について、液体培養を行いクエン酸生産性の相違を調べた。ミトコンドリア局在の推定輸送体をコードする 8 種の遺伝子破壊株、細胞膜局在の推定輸送体をコードする 2 種の遺伝子の破壊株、機能未知タンパク質をコードする 3 種の遺伝子破壊株、野生型及び細胞質ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子破壊株を有するヘテロカリオン株について、クエン酸生産用液体培養を行った。推定細胞膜アニオンチャネル (AKAW\_07940、

AKAW\_08833)、推定グルタミン輸送体 (AKAW\_04269)、推定ミトコンドリア膜ADP輸送体 (AKAW\_00314)、機能未知遺伝子 (AKAW\_05924)の破壊株において、クエン酸の生産量が親株に比べ2倍以上増加した。一方、推定ジカルボン酸輸送体 (AKAW\_02096)の破壊株ではクエン酸生産量が親株の1/2に減少した(図2)。

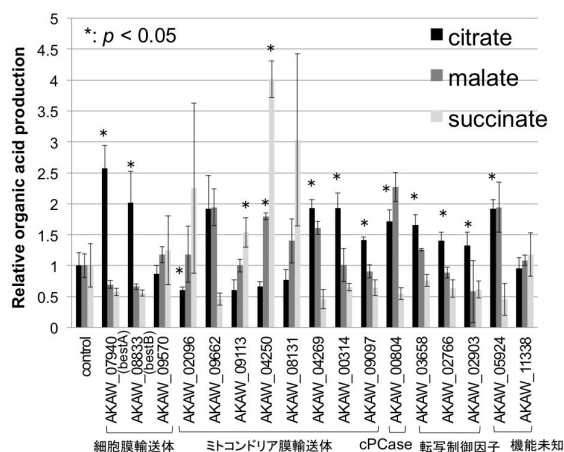


図2. 白麹菌破壊株の液体培養での有機酸生産

一方、白麹菌破壊株を用いて、固体培養を行い、培養後抽出される有機酸量を調べた。分析対象の34種の破壊株のうち24の破壊株でリンゴ酸量の変動が認められたが、クエン酸量の変動は6種の破壊株に認められた。推定細胞質リンゴ酸脱水素酵素遺伝子、推定C6転写因子をコードする遺伝子、機能未知遺伝子、及び推定ミトコンドリア局在コハク酸-フマル酸輸送体においては、親株に比べクエン酸量が減少しており、逆にリンゴ酸量が増加していた。また、MATE efflux family protein をコードする2つの遺伝子破壊株では、ともにクエン酸量が増加し、1つの破壊株でクエン酸量が減少した。クエン酸生産量とリンゴ酸生産量に逆相関があった。また、細胞膜輸送体の破壊株では液体培養と固体培養の培養条件により結果が異なった。液体培養と固体培養では、クエン酸高生産に関与する遺伝子の働き、挙動が異なっている可能性が示唆された。遺伝子破壊によってクエン酸生産性に变化をもたらした遺伝子について、糸状菌での実際の遺伝子、その産物であるタンパク質機能を明らかにする必要がある。

#### (6) 白麹菌へのイタコン酸生産能の獲得

イタコン酸は不飽和ジカルボン酸であり、プラスチック、樹脂、合成繊維のモノマー原料として利用されている。*A. itaconicus* 及び *A. terreus* によってのみ生産されることが知られている。イタコン酸は、TCA 回路中のクエン酸から脱水されて *cis*-aconitate へ変換されたのち、さらに細胞質の *cis*-aconitate decarboxylase (CAD) によって脱炭酸されることで合成され、最終的に培地へ分泌生産される。CAD は *A. terreus*

においてのみ同定されている。本研究ではイタコン酸生産の原料となるクエン酸を大量に生産する安全な白麹菌に、*ccad* 遺伝子を導入してイタコン酸の生産を試みた。また、*cad* 遺伝子については病原菌 *A. terreus* ではなく *A. itaconicus* から新たにクローニングして利用した。

*A. itaconicus* NBRC 4336 株のゲノム DNA を、Roche 454 シーケンサーにてショットガンシーケンスを行った。得られたドラフトゲノム情報から、*A. terreus* の *cadA* (ATEG\_09971) とそのホモログ *cadA like* (*cadA1*, ATEG\_08909) と相同性を示す配列を探索した。*A. itaconicus* の contig00128 中に *AtcadA* に最も高い相同性を示す配列が存在したため *AicadA* とした。一方、*A. itaconicus* の contig00097 中に *AtcadA1* に最も高い相同性を示す配列が存在し、*AicadA1* とした。*AicadA* 及び *AicadA1* をそれぞれ、白麹菌の *argB* 遺伝子座に部位特異的に導入するベクターを構築した。各 *Aicad* 遺伝子は、グルコース存在下で構成的に発現する *gpdA* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) のプロモーターを利用した。*argB* マーカーをもつこれら発現ベクターを白麹菌高効率相同組換え株に導入して、*argB* 遺伝子座に遺伝子ターゲティングした形質転換体を取得した。クエン酸生産用液体培地にてそれぞれのイタコン酸生産量を調べたが、*AicadA* 及び *AicadA1* 導入株ともに培地中のイタコン酸の生産は認められなかった。今後、使用した培地、培養条件下で *Aicad* 遺伝子の発現が行われているのか、菌体内にイタコン酸が生産されていないのかなど、詳細に確認する必要がある。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

- Tashiro, S., Futagami, Wada, S., T., Kajiwara, Y., Takashita, H., Omori, T., Takahashi, T., Yamada, O., Takegawa, K., and Goto, M. (2013) Construction of a *ligD* disruptant for efficient gene targeting in white koji mold, *Aspergillus kawachii*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 59 (3) 257-260, 査読有。
- 後藤正利, 二神泰基, 梶原康博、高下秀春. (2014) 焼酎麹菌の Identity を探る. 日本醸造協会誌, 109, 219-227, 査読無。
- Futagami, T., Mori, K., Wada, S., Ida, H., Kajiwara, Y., Takashita, H., Tashiro, K., Yamada, O., Omori, T., Kuhara, S., and Goto, M. (2015) Transcriptomic analysis of temperature responses of *Aspergillus kawachii* during barley koji production. *Appl. Environ. Microbiol.* 81 (4) 1353-1363, 査読有。

〔学会発表〕(計 16 件)

後藤正利. ゲノム情報を活用し焼酎麹菌の Identity を探る. ゲノムを基盤とした次世代微生物学研究の展開. 2012.7.17. 宮崎大学.

S. Tashiro, T. Futagami, Y. Kajiwara, H. Takashita, T. Omori, K. Takegawa, and M. Goto. Construction of White koji mold, *Aspergillus kawachii* strains for genetic study. 15th International Biotechnology Symposium. 2012.9.18. Daegu, Korea.

T. Futagami, K. Mori, A. Yamashita, S. Wada, Y. Kajiwara, H. Takashita, T. Omori, K. Takegawa, K. Tashiro, S. Kuhara and M. Goto. Genomic sequence of the shochu koji mold *Aspergillus kawachii*. 15th International Biotechnology

Symposium. 2012.9.18. Daegu, Korea  
田代智史、二神泰基、梶原康博、高下秀春、大森俊郎、竹川薫、後藤正利. 白麹菌 *Aspergillus kawachii* における遺伝子工学実験宿主の開発. 日本醸造学会第 4 回若手シンポジウム. 2012.9.27. 東京.  
田代智史、二神泰基、梶原康博、高下秀春、大森俊郎、竹川薫、後藤正利. 白麹菌 *Aspergillus kawachii* の遺伝子工学実験宿主の開発. 第 64 回日本生物工学会大会. 2012.10.23-26. 神戸.

二神泰基、森一樹、和田正太郎、梶原康博、高下秀春、大森俊郎、田代康介、久原哲、後藤正利. 麦麹の製造過程における白麹菌の DNA マイクロアレイ解析. 日本農芸化学会 2013 年度大会. 2013.3.27. 東北大学.

田代智史、二神泰基、梶原康博、高下秀春、竹川薫、後藤正利. 白麹菌における遺伝子工学実験宿主の開発. 生物工学会若手研究者の集い・夏のセミナー 2013.7.13-14. 宮崎.

後藤正利、二神泰基、梶原康博、高下秀春. 焼酎麹菌の Identity を探り、活用する. 第 65 回日本生物工学会大会・シンポジウム. 2013.9.18-20. 広島国際会議場.

二神泰基、森一樹、和田正太郎、梶原康博、高下秀春、大森俊郎、田代康介、久原哲、後藤正利. 麦麹の製造過程における白麹菌のマイクロアレイ解析. 第 65 回日本生物工学会大会. 2013.9.18-20. 広島国際会議場

田代智史、二神泰基、梶原康博、高下秀春、竹川薫、後藤正利. 白麹菌 *Aspergillus kawachii* における推定有機酸トランスポーターの機能解析. 第 5 回日本醸造学会若手シンポジウム. 2013.10.17-18. 東京. 北とぴあ.

二神泰基、森一樹、和田正太郎、梶原康博、高下秀春、大森俊郎、田代康介、久

原哲、後藤正利. 麦麹の製造過程における白麹菌のトランスクリプトーム解析. 第 13 回糸状菌分子生物学コンファレンス. 2013. 11. 20-21. つくば.

田代智史、二神泰基、梶原康博、高下秀春、竹川薫、後藤正利. 白麹菌 *Aspergillus kawachii* における推定有機酸トランスポーターの機能解析. 第 20 回日本生物工学会九州支部大会. 2013.12.7. 佐賀大学.  
田代智史、二神泰基、森一樹、和田正太郎、田代康介、久原哲、梶原康博、高下秀春、竹川薫、後藤正利. 白麹菌 *Aspergillus kawachii* のクエン酸高生産に関わる遺伝子の探索. 日本農芸化学会東京大会、明治大学. 2014.3.29

後藤正利. 白麹菌のポストゲノム解析についての研究: 白麹菌らしさを探る. 糸状菌遺伝子研究会第 35 回例会. 東京都北とぴあ 2014.6.20

M. Goto, T. Futagami, Y. Kajiwara, and H. Takashita. Identification of the genes that affect productivity of organic acids in *Aspergillus kawachii*. 10<sup>th</sup> International Mycological Congress, Bangkok, 2014.8.5

後藤正利、田代智史、二神泰基、竹川薫、梶原康博、高下秀春. 白麹菌 *Aspergillus kawachii* のクエン酸高生産に関わる遺伝子の探索. 日本生物工学会札幌大会、札幌国際会議場. 2014.9.9

〔図書〕(計 1 件)

- 1) 後藤正利、梶原康博、高下秀春. ゲノム・ポストゲノム解析により焼酎麹菌らしさを探る. 「発酵・醸造食品の最前線」監修 北本勝ひこ、シーエムシー出版. pp.164-171(2015)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)  
取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.brs.kyushu-u.ac.jp/~fcmic/Top.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 正利 (GOTO MASATOSHI)

九州大学・大学院農学研究院・准教授  
研究者番号: 90274521

(2) 研究分担者

二神 泰基 (FUTAGAMI TAIKI)

鹿児島大学・農学部・准教授  
研究者番号: 60512027