

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05773

研究課題名（和文）麹の品質を決定する遺伝子発現制御の分子機構

研究課題名（英文）Gene regulatory mechanisms involved in the quality of the white koji

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：焼酎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ことができる。本研究では、白麹菌のクエン酸高生産機構においてクエン酸排出輸送体 CexA が中心的な役割を担っていることを明らかにした。また、推定メチルトランスフェラーゼ LaeA が *cexA* 遺伝子の発現をエピジェネティックに制御す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

白麹菌が分泌生産するクエン酸は、焼酎製造において雑菌の増殖を防ぐ重要な役割がある。また、白麹菌と近縁の *Aspergillus niger* 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クエン酸排出輸送体 CexA と推定メチルトランスフェラーゼ LaeA 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および微生物育種に役立つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The white koji fungus, *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii*, is able to secrete a large amount of citric acid. In this study, we revealed that the expression level of citrate exporter CexA is significantly important for the citric acid productivity among koji fungi. We also revealed that the gene expression of *cexA* is epigenetically regulated by the putative methyltransferase LaeA.

研究分野：応用微生物学

キーワード：白麹菌 クエン酸 メチルトランスフェラーゼ LaeA クエン酸排出輸送体 CexA 転写制御 エピジェネティクス

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 白麹菌 *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* は、焼酎の製造に用いられる麹菌である。米や大麦など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を供給することに加えて、クエン酸を多量に生産する性質をあわせもつ。

(2) 白麹菌の類縁菌である *Aspergillus niger* と *Aspergillus carbonarius* において、推定メチルトランスフェラーゼ遺伝子 *laeA* の欠損がクエン酸生産の劇的な低下をもたらすことが報告された (①, ②)。しかし、これらの糸状菌において *LaeA* がクエン酸生産を制御する機構は明らかにされていない。

(3) *A. niger* において、クエン酸排出輸送体 *CexA* がクエン酸高生産に極めて重要であることが報告された (③, ④)。しかし、*cexA* 遺伝子の発現制御機構は明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

(1) 白麹菌のクエン酸高生産機構の解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 白麹菌 S02 株を形質転換の親株として使用した (⑤)。なお、比較対象の株と同じ栄養要求性を示す株をコントロール株とした。白麹菌は最少培地 (⑤) で培養した。最少培地には、必要に応じて 0.8 M NaCl、1.5% (wt/vol) 寒天、0.211% (wt/vol) アルギニン、あるいは 0.02% (wt/vol) メチオニンを添加した。また、有機酸生産性を視覚的に評価するために YPD 寒天培地 + 2% メチルレッドで培養した。メチルレッドは 100 mg を 100 ml のエタノールに溶解した後、0.1% (wt/vol) の NaOH を赤色から黄色に変化するまで添加したものを使用した。さらに、クエン酸生産量の測定には、クエン酸生産 (CAP) 液体培地 (⑤) を使用した。

(2) 白麹菌において *laeA* ホモログ遺伝子 (*laeA*、*laeA2*、*laeA3*) の破壊株を構築した。相同領域として各遺伝子の 5' -UTR と 3' -UTR、および選択マーカーとして *argB* 遺伝子を PCR によって増幅し、融合 PCR によって各断片を連結した。破壊カセットを S02 株に導入し、アルギニンを含有しない最少培地で形質転換体を選択した。

(3) 白麹菌において *laeA* 破壊株の相補株を構築した。*laeA* の 5' -UTR を含む ORF 領域、選択マーカーとして *sC* 遺伝子、3' 側の相同領域として *argB* を PCR によって増幅し、融合 PCR により各断片を連結することで相補カセットを構築した。形質転換体はメチオニンを含有しない最少培地で選択した。また、親株の *laeA* 破壊株 ( $\Delta sC \Delta laeA$ ) は相補株 ( $\Delta laeA + laeA$ ) と栄養要求性をそろえるために *sC* を相補した。白麹菌 IFO (NBRC) 4308 株のゲノム DNA を用いて *sC* を増幅して形質転換し、メチオニンを含有しない最少培地により選択した。

(4) 白麹菌において推定細胞膜局在型クエン酸輸送体をコードする *cexA* 遺伝子の破壊株を構築した。相同領域として 5' -UTR と 3' -UTR、選択マーカーとして *argB* を PCR によって増幅し、融合 PCR により、各断片を連結して破壊カセットを構築した。形質転換体はアルギニンを含有しない最少培地で選択した。*cexA* の破壊を確認した後、*sC* を相補した。

(5) 白麹菌において *cexA* 過剰発現株を構築した。プラスミド pGS-PgpdA (⑤) を過剰発現用ベクターとして用いた。*cexA* の ORF を IFO 4308 株のゲノム DNA を鋳型として PCR により増幅した。増幅した断片を線状化した pGS-PgpdA に In-Fusion HD cloning kit (Takara Bio) を用いてクローニングし、プラスミド pGS-PgpdA-*cexA* とした。pGS-PgpdA-*cexA* を  $\Delta sC \Delta cexA$  と  $\Delta sC \Delta laeA$  に導入し、*cexA* 過剰発現株として  $\Delta cexA OE_{cexA}$  と  $\Delta laeA OE_{cexA}$  を構築した。

(6) 白麹菌の細胞内外の有機酸濃度を測定した。白麹菌の分生子  $2.0 \times 10^7$  を 100 ml の最少培地に接種して前培養 (180 rpm、30°C、36 h) した。その後、菌体を 50 ml の CAP 培地に移して本培養 (163 rpm、30°C、48 h) した。培養上清を細胞外画分とした。凍結破碎した菌体 1 g に対し 10 ml の熱水 (80°C) を加え、ボルテックスでよく混合し、138,000×g、4°C、30 min で遠心した。上清を回収して細胞内画分とした。有機酸は Prominence HPLC system (Shimadzu) と CDD-10AVP conductivity detector (Shimadzu) により定量した。

(7) 白麹菌のトランスクリプトーム解析を CAGE (Cap Analysis of Gene Expression) -Seq により行った。まず、分生子  $2 \times 10^7$  を 100 ml の最少培地に接種し、30°C で 36 h 前培養を行った。その後、菌体を 50 ml の CAP 培地に移して、さらに 30°C で 12 h 培養することでクエン酸生産を誘導した。その後、凍結破碎した菌体からの RNAiso plus (Takara Bio) と SV total RNA isolation

system (Promega) で RNA を抽出した。ライブラリー調整、シーケンス、およびデータ解析は株式会社ダナフォームにおいて行われた。データは NCBI の GEO (Gene Expression Omnibus) に accession number GSE135849 として登録した。

(8) 白麴菌において *cexA* の転写レベルを解析した。まず、 $2 \times 10^7$  の分生子を 100 ml の最少培地に接種し、30°C で 36 h 前培養を行った。その後、50 ml の CAP 培地に移し、さらに 30°C で 12 h 培養することでクエン酸生産を誘導した。その後、集菌して RNAiso plus で RNA を抽出した。cDNA の合成は PrimeScript Perfect Real-Time Reagent Kit (Takara Bio) を用いて行った。Real time RT-PCR は SYBR *Premix Ex Taq* II (Tli RNaseH Plus) (Takara Bio) を用いて行った。ハウスキーピング遺伝子として、*actA* を使用した。

(9) 白麴菌においてクロマチン免疫沈降 (ChIP) -qPCR 解析を行った。ChIP は、先行研究において報告された方法 (6) を参考にした。normal mouse IgG 抗体 (Cosmo Bio)、anti-histone H3 抗体 (Medical and Biological Laboratories)、anti-histone H3K4 me3 抗体 (Medical and Biological Laboratories)、anti-histone H3K9 me3 抗体 (Medical and Biological Laboratories) を使用した。DNA の定量は SYBR *Premix Ex Taq* II (Tli RNaseH Plus) を用いて行った。プライマーは、*cexA* の開始コドンから +2~+26 と +238~+257 に設計した。相対量 (% input DNA) は、免疫沈降により回収した DNA 量を input DNA 量で除することで算出した。

#### 4. 研究成果

(1) 白麴菌のゲノムにコードされる LaeA 様推定メチルトランスフェラーゼとして、AKAW\_04823、AKAW\_11001、AKAW\_06012 を同定した。LaeA (7) との相同性に基づいて、AKAW\_04823 を LaeA、AKAW\_11001 を LaeA2、AKAW\_06012 を LaeA3 として解析した。白麴菌において、*laeA*、*laeA2*、*laeA3* の破壊株を構築し、表現型を観察した (図 1A)。コントロール株は各破壊株と同じ栄養要求性を示す株とした。すなわち、コントロール株として *sC* 遺伝子の欠損株を使用した。 $\Delta sC \Delta laeA$  株は最少培地において、コントロール株、 $\Delta sC \Delta laeA2$  株、 $\Delta sC \Delta laeA3$  株と比較して、コロニー形態に違いは見られなかったが、菌糸面の黄色色素が消失した (図 1A)。この結果から、*A. niger* において LaeA が二次代謝を正に制御するという知見 (1, 2) と同様に、白麴菌の黄色色素の生産を正に制御することが示唆された。次に、pH 指示薬であるメチルレッドを添加した YPD 培地で培養したところ、 $\Delta sC \Delta laeA$  株において赤色のハローが消失した (図 1A)。この結果から、*laeA* が白麴菌のクエン酸生産に関与することが示唆された。次に、白麴菌のクエン酸生産機構におけるこれらの LaeA ホモログの役割を明らかにするために、培養上清のクエン酸濃度、凍結菌体重量、および菌体量当たりのクエン酸生産量を測定した。その結果、 $\Delta sC \Delta laeA$  株の培養上清中のクエン酸濃度はコントロール株の 0.07 倍に低下した (図 1B)。一方、菌体量はコントロール株の 1.82 倍に増加した (図 1C)。また、培養上清のクエン酸濃度および、菌体量に基づいて、 $\Delta sC \Delta laeA$  株の菌体量当たりのクエン酸生産量はコントロール株の 0.04 倍に低下した (図 1D)。一方、 $\Delta sC \Delta laeA2$ 、 $\Delta sC \Delta laeA3$  株のクエン酸生産量はコントロール株と同等の値を示した。以上の結果から、LaeA はクエン酸生産およびクエン酸生産時における菌糸伸長に重要な役割をもつことが示唆された。

(2)  $\Delta sC \Delta laeA$  株においてクエン酸生産量の低下が見られたため、*sC* を用いて *laeA* 遺伝子の相補 ( $\Delta laeA+laeA$ ) を行った。また、相補株と栄養要求性を揃えるため、 $\Delta sC \Delta laeA$  株に *sC* を相補 ( $\Delta laeA$ ) した。これらの菌株のクエン酸生産を評価するために、培養上清を細胞外面分として、また菌体から有機酸を抽出して細胞内面分として各種有機酸を比較した。まず、細胞外面分において、 $\Delta laeA$  株はクエン酸濃度がコントロール株と比較して 0.08 倍に低下した (図 2A)。次に、リンゴ酸と 2-オキシグルタル酸濃度もそれぞれ 0.64 倍、0.7 倍と低下傾向にあったものの、有意差はなか

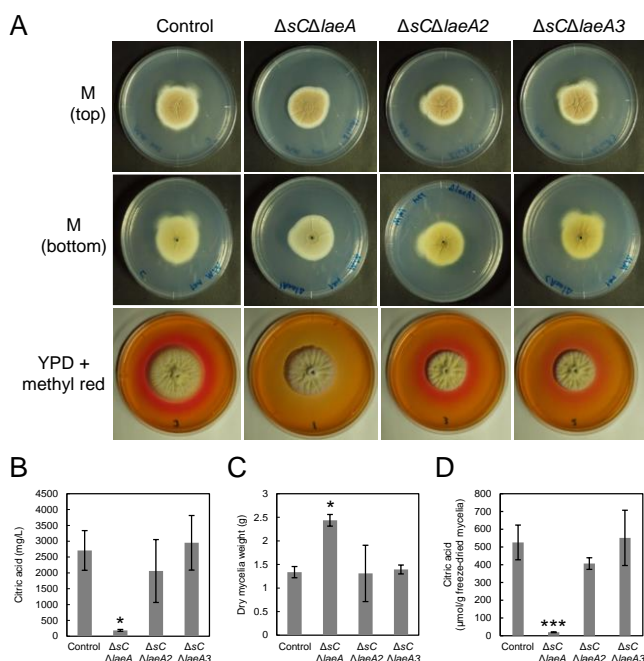


図1 白麴菌の *laeA* ホモログ破壊株のコロニー (A)、クエン酸 (B)、菌体量 (C)、菌体あたりクエン酸量 (D)

った。また、これら細胞外画分の有機酸濃度の低下は *laeA* の相補により回復した。一方、細胞内画分において  $\Delta laeA$  株はコントロール株と比較して、クエン酸濃度が 0.46 倍、リンゴ酸濃度が 0.55 倍、2-オキソグルタル酸濃度が 0.46 倍に低下した (図 2B)。細胞内のクエン酸とリンゴ酸の濃度は *laeA* の相補により回復したものの、2-オキソグルタル酸濃度は  $\Delta laeA + laeA$  株においてもコントロール株の 0.71 倍程度までには回復しなかった。以上の結果より、LaeA は細胞内と細胞外の両方における有機酸生産に関与しており、特に細胞外のクエン酸の蓄積に重要な役割をもつことが示唆された。

(3) クエン酸生産誘導時に LaeA が制御する遺伝子について明らかにするため、コントロール株と  $\Delta laeA$  株の遺伝子発現を網羅的に比較した。コントロール株と  $\Delta laeA$  株を最少培地で 36 h 前培養した後、CAP 培地で 12 h 本培養することでクエン酸生産を誘導した。得られた菌体から RNA を抽出し、CAGE-Seq によりトランスクリプトーム解析を行った。コントロール株と  $\Delta laeA$  株間の遺伝子発現変動について、false discovery rate < 0.05 かつ  $\log_2$  fold change < -0.5 または > 0.5 となる遺伝子を発現変動有りとして解析した。その結果、推定発現変動遺伝子として 1248 遺伝子を抽出し、そのうち 590 遺伝子の発現が上昇し、658 遺伝子の発現が低下したことが示唆された。Gene Ontology 解析の結果、代謝や輸送に関わる遺伝子群が多く含まれることが明らかとなったが、*laeA* の破壊によりクエン酸生産が低下した原因を解釈できなかった。そこで、クエン酸生産に直接的に関連する代謝系に着目した。まず、クエン酸合成酵素である AKAW\_00170 と AKAW\_06223 は *laeA* の破壊により発現量が低下していた。特に AKAW\_06223 は  $\log_2$  fold change が -11.35 と、これら遺伝子の中で最も発現量が低下していた。しかしながら、AKAW\_06223 はクエン酸合成酵素のオルソログにおいて発現レベルは低いため、クエン酸高生産に対する寄与は少ないことが考えられた。次に、クエン酸排出輸送体に注目した。*A. niger* において細胞質膜のクエン酸輸送体であると報告された CexA (③, ④) のホモログをコードする AKAW\_07989 の発現が、*laeA* の破壊により顕著に低下 ( $\log_2$  fold change = -6.09) した。なお、AKAW\_07989 と *A. niger* の CexA のアミノ酸相同性は 96% であり、AKAW\_07989 が白麹菌における CexA であると推察された。また、 $\Delta laeA$  株の細胞外クエン酸濃度はコントロール株と比較して顕著に低下したこともあり (図 2A)、*cexA* の発現の低下が細胞外のクエン酸の蓄積に負の影響を及ぼした可能性に着目した。

(4) *laeA* の破壊により *cexA* 遺伝子の発現が低下したことがクエン酸低生産の原因かどうかを明らかにするため、コントロール株、 $\Delta laeA$  株、 $\Delta cexA$  株、 $\Delta laeA$  OE*cexA* 株、 $\Delta cexA$  OE*cexA* 株のクエン酸生産性を比較した。*cexA* の強制発現にはグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼをコードする *gpdA* 遺伝子のプロモーターを用いた。なお、CAGE-Seq のデータから、*gpdA* はコントロール株と  $\Delta laeA$  株で発現が変動せず、LaeA の制御下でないことを確認した。各株を最少培地で 36 h 前培養した後、CAP 培地で 48 h 本培養し、菌体量当たりのクエン酸生産量を比較した。その結果、 $\Delta cexA$  株は  $\Delta laeA$  株と同様に、細胞外のクエン酸の蓄積はほとんどみられず、コントロール株と比較して約 0.01 倍に低下した。また、 $\Delta laeA$  OE*cexA* 株と  $\Delta cexA$  OE*cexA* 株はコントロール株と比較して、それぞれ 2.33 倍、3.35 倍にクエン酸生産量が増加した。一方、 $\Delta laeA$  OE*cexA* 株は  $\Delta cexA$  OE*cexA* 株とほぼ同様のクエン酸生産量を示したことから、 $\Delta laeA$  株のクエン酸低生産の主要な原因が *cexA* の発現量の低下であることが示唆された。

(5) *cexA* の発現低下が  $\Delta laeA$  株のクエン酸低生産の主要な原因であることが示唆されたため、コントロール株と  $\Delta laeA$  株、 $\Delta laeA$  OE*cexA* 株における *cexA* の転写誘導性を比較した。各株を最少培地で 36 h 前培養した後、CAP 培地で 12 h 培養しクエン酸生産を誘導した。この時、前培養した菌体からも RNA を抽出して培養 0 h として解析した。コントロール株では、CAP 培地で 12 h 培養することで、0 h と比較して *cexA* の転写量が 24 倍に上昇した。一方、 $\Delta laeA$  株においては 0 h と 12 h の *cexA* の転写量に違いが見られなかった。この結果から、LaeA は *cexA* の転写誘導に重要な役割をもつことが示唆された。一方、 $\Delta laeA$  OE*cexA* 株は培養 12 h においてはコントロール株と同様の *cexA* の

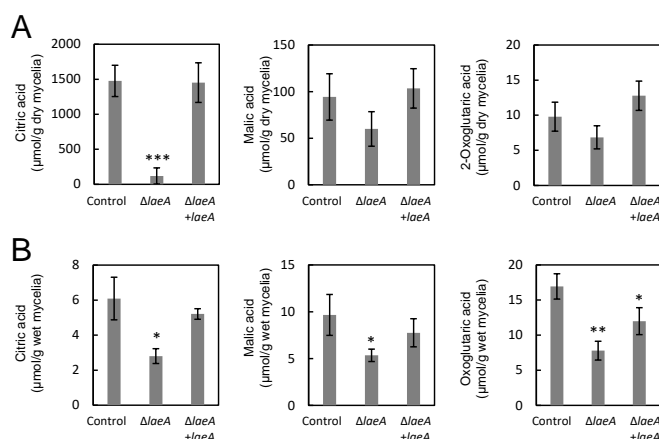


図2 白麹菌の*laeA*破壊株の細胞外(A)と細胞内(B)のクエン酸、リンゴ酸、オキソグルタル酸生産量

転写量を示したが、0 h 目においてはコントロール株と比較して66倍高かった。このことから、 $\Delta laeA$  OEcexA株がコントロール株と比較して高いクエン酸生産性を示すのは、CAP培地での培養初期からcexAの転写が活発であることが原因であると考えられた。

(6) LaeAはヒストンのメチル化修飾に関与することで遺伝子発現をエピジェネティックに制御すると考えられている(⑦, ⑧)。そこで、LaeAに依存したcexAのヒストン修飾による発現制御機構を明らかにするため、コントロール株と $\Delta laeA$ 株において、anti-histone H3抗体、anti-histone H3K4 me3抗体、anti-histone H3K9 me3抗体を用いたChIP-qPCR解析を行った。H3K4 me3はユークロマチン領域の指標であり、H3K9 me3はヘテロクロマチン領域の指標である。ChIP-qPCR解析の結果、cexA領域のヒストンH3の占有率はコントロール株と $\Delta laeA$ 株において違いは認められなかった(図3A)。一方、 $\Delta laeA$ 株のH3K4 me3(ユークロマチンマーカー)占有率はネガティブコントロールと同等の値まで低下しており(図3B)、H3K9 me3占有率(ヘテロクロマチンマーカー)はコントロール株と比較して上昇していた(図3C)。この結果から、LaeAはヒストン修飾を介して白麹菌のcexA領域のユークロマチン/ヘテロクロマチン比を制御することで、cexAの発現を制御することが示唆された。

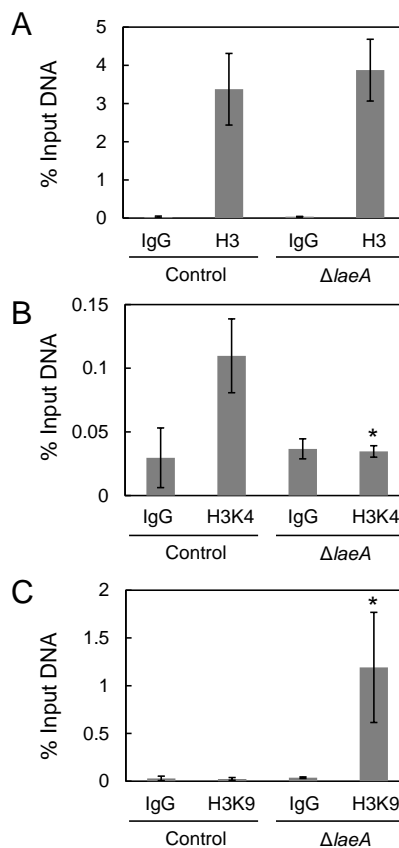


図3 Histone H3抗体(A)、Histone H3K4me3抗体(B)、Histone H3K9me3抗体(C)によるcexAプロモーター領域のChIP-qPCR解析

#### <引用文献>

- ① Niu J, Arentshorst M, Nair PD, Dai Z, Baker SE, Frisvad JC, Nielsen KF, Punt PJ, Ram AF. Identification of a classical mutant in the industrial host *Aspergillus niger* by systems genetics: LaeA is required for citric acid production and regulates the formation of some secondary metabolites. *G3 (Bethesda)* 2015;6:193-204.
- ② Linde T, Zoglowek M, Lübeck M, Frisvad JC, Lübeck PS. The global regulator LaeA controls production of citric acid and endoglucanases in *Aspergillus carbonarius*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2016;43:1139-1147.
- ③ Odoni DI, Vazquez-Vilar M, van Gaal MP, Schonewille T, Martins Dos Santos VAP, Tamayo-Ramos JA, Suarez-Diez M, Schaap PJ. *Aspergillus niger* citrate exporter revealed by comparison of two alternative citrate producing conditions. *FEMS Microbiol Lett* 2019;366:fnz071.
- ④ Steiger MG, Rassinger A, Mattanovich D, Sauer M. Engineering of the citrate exporter protein enables high citric acid production in *Aspergillus niger*. *Metab Eng* 2019;52:224-231.
- ⑤ Kadooka C, Nakamura E, Mori K, Okutsu K, Yoshizaki Y, Takamine K, Goto M, Tamaki H, Futagami T. LaeA controls citric acid production through regulation of the citrate exporter-encoding cexA Gene in *Aspergillus luchuensis* mut. kawachii. *Appl Environ Microbiol* 2020;86:e01950-19.
- ⑥ Bernreiter A, Ramon A, Fernández-Martínez J, Berger H, Araújo-Bazan L, Espeso EA, Pachlinger R, Gallmetzer A, Anderl I, Scazzocchio C, Strauss J. Nuclear export of the transcription factor NirA is a regulatory checkpoint for nitrate induction in *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol* 2007;27:791-802.
- ⑦ Bok JW, Keller NP. LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryot Cell* 2004;3:527-535.
- ⑧ Reyes-Dominguez Y, Bok JW, Berger H, Shwab EK, Basheer A, Gallmetzer A, Scazzocchio C, Keller N, Strauss J. Heterochromatic marks are associated with the repression of secondary metabolism clusters in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 2010;76:1376-1386.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Mori Kazuki, Kadooka Chihiro, Nishitani Atsushi, Okutsu Kayu, Yoshizaki Yumiko, Takamine Kazunori, Tashiro Kosuke, Goto Masatoshi, Tamaki Hisanori, Futagami Taiki	4. 巻 10
2. 論文標題 Chromosome-Level Genome Sequence of the Black Koji Fungus <i>Aspergillus luchuensis</i> RIB2601	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e0038421
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.00384-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Mori Kazuki, Kadooka Chihiro, Oda Ken, Okutsu Kayu, Yoshizaki Yumiko, Takamine Kazunori, Tashiro Kosuke, Goto Masatoshi, Tamaki Hisanori, Futagami Taiki	4. 巻 41
2. 論文標題 Chromosome-level genome sequence data and analysis of the white koji fungus, <i>Aspergillus luchuensis</i> mut. kawachii IFO 4308	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Data in Brief	6. 最初と最後の頁 107888 ~ 107888
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dib.2022.107888	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Futagami Taiki	4. 巻 86
2. 論文標題 The white koji fungus <i>Aspergillus luchuensis</i> mut. kawachii	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 574 ~ 584
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbac033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Futagami Taiki, Goto Masatoshi	4. 巻 15
2. 論文標題 Insights regarding sirtuin-dependent gene regulation during white koji production	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communicative & Integrative Biology	6. 最初と最後の頁 92 ~ 95
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/19420889.2022.2051844	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura E, Kadooka C, Okutsu K, Yoshizaki Y, Takamine K, Goto M, Tamaki H, Futagami T	4. 巻 131
2. 論文標題 Citrate exporter enhances both extracellular and intracellular citric acid accumulation in the koji fungi <i>Aspergillus luchuensis</i> mut. <i>kawachii</i> and <i>Aspergillus oryzae</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 68-76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2020.09.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kadooka C, Yamaguchi M, Okutsu K, Yoshizaki Y, Takamine K, Katayama T, Maruyama JI, Tamaki H, Futagami T	4. 巻 84
2. 論文標題 A CRISPR/Cas9-mediated gene knockout system in <i>Aspergillus luchuensis</i> mut. <i>kawachii</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2179-2183
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kadooka C, Nakamura E, Mori K, Okutsu K, Yoshizaki Y, Takamine K, Goto M, Tamaki H, Futagami T	4. 巻 86
2. 論文標題 LaeA controls citric acid production through regulation of the citrate exporter-encoding <i>cexA</i> gene in <i>Aspergillus luchuensis</i> mut. <i>kawachii</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e01950-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AEM.01950-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyamoto A, Kadooka C, Mori K, Tagawa Y, Okutsu K, Yoshizaki Y, Takamine K, Goto M, Tamaki H, Futagami T	4. 巻 129
2. 論文標題 Sirtuin SirD is involved in $\alpha$ -amylase activity and citric acid production in <i>Aspergillus luchuensis</i> mut. <i>kawachii</i> during a solid-state fermentation process	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 454-466
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2019.11.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計23件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 二神 泰基
2. 発表標題 白麹菌のクエン酸高生産機構に関する研究
3. 学会等名 第41回糸状菌遺伝子研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 二神 泰基
2. 発表標題 白麹菌のクエン酸高生産機構に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会西日本支部例会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林 那波、池田 萌、門岡 千尋、奥津 果優、吉崎 由美子、高峯 和則、後藤 正利、玉置 尚徳、二神 泰基
2. 発表標題 白麹菌におけるMAPキナーゼを介したクエン酸生産制御機構の解析
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上 太雅、山口 正晃、門岡 千尋、奥津 果優、吉崎 由美子、高峯 和則、後藤 正利、玉置 尚徳、二神 泰基
2. 発表標題 白麹菌 <i>Aspergillus luchuensis</i> mut. <i>kawachii</i> における $\alpha$ -アミラーゼAmyBの機能解析
3. 学会等名 日本醸造学会大会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 井上 太雅、山口 正晃、門岡 千尋、奥津 果優、吉崎 由美子、高峯 和則、後藤 正利、玉置 尚徳、二神 泰基
2. 発表標題 白麹菌Aspergillus kawachiiにおける $\alpha$ -アミラーゼAmyBの機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会西日本・中四国・関西支部合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 二神泰基
2. 発表標題 白麹菌のクエン酸高生産機構に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 二神泰基、門岡千尋、後藤正利、玉置尚徳
2. 発表標題 白麹菌のクエン酸高分泌生産に関わるトランスポーターの解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口正晃、門岡千尋、奥津果優、吉崎由美子、高峯和則、後藤正利、玉置尚徳、二神泰基
2. 発表標題 白麹菌における $\alpha$ -アミラーゼAmyBの機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田萌、門岡千尋、奥津果優、吉崎由美子、高峯和則、後藤正利、玉置尚徳、二神泰基
2. 発表標題 白麹菌におけるMAPキナーゼを介したクエン酸生産制御機構の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 二神泰基
2. 発表標題 麹菌のクエン酸生産能力の鍵をにぎる排出輸送体
3. 学会等名 日本農芸化学会北海道支部 / 日本栄養・食糧学会北海道支部合同学術講演会プログラム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口正晃、門岡千尋、奥津果優、吉崎由美子、高峯和則、片山琢也、丸山潤一、玉置尚徳、二神泰基
2. 発表標題 白麹菌における CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集
3. 学会等名 2020年度日本フードファクター学会・日本農芸化学会西日本支部合同大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池田萌、門岡千尋、奥津果優、吉崎由美子、高峯和則、後藤正利、玉置尚徳、二神泰基
2. 発表標題 白麹菌における MAP キナーゼを介したクエン酸生産制御機構の解析
3. 学会等名 2020年度日本フードファクター学会・日本農芸化学会西日本支部合同大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口正晃、門岡千尋、奥津果優、吉崎由美子、高峯和則、片山琢也、丸山潤一、玉置尚徳、二神泰基
2. 発表標題 白麹菌のCRISPR/Cas9によるゲノム編集
3. 学会等名 令和2年度日本醸造学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池田萌、森一樹、奥津果優、吉崎由美子、高峯和則、後藤正利、玉置尚徳、二神泰基
2. 発表標題 白麹菌におけるサーチュインSirDの解析
3. 学会等名 令和2年度日本醸造学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 二神泰基
2. 発表標題 白麹の品質を制御するストレス応答機構
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度福岡大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 門岡千尋、中村恵理、池田萌、森一樹、奥津果優、吉崎由美子、高峯和則、後藤正利、玉置尚徳、二神泰基
2. 発表標題 白麹菌における推定メチルトランスフェラーゼLaeAによるクエン酸生産制御機構の解析
3. 学会等名 日本生物工学会第26回九州支部長崎大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 二神泰基
2. 発表標題 白麹菌の細胞質膜局在推定クエン酸輸送体CexAの機能と発現制御機構
3. 学会等名 第11回トランスポーター研究会九州部会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 二神泰基、門岡千尋、中村恵理、森一樹、奥津果優、吉崎由美子、高峯和則、後藤正利、玉置尚徳
2. 発表標題 白麹菌におけるLaeAによるクエン酸生産制御機構の解析
3. 学会等名 第19回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 門岡千尋、中村恵理、池田萌、森一樹、奥津果優、吉崎由美子、高峯和則、後藤正利、玉置尚徳、二神泰基
2. 発表標題 白麹菌における推定メチルトランスフェラーゼLaeAによるクエン酸生産制御機構の解析
3. 学会等名 第11回日本醸造学会若手シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 門岡千尋、中村恵理、池田萌、森一樹、奥津果優、吉崎由美子、高峯和則、後藤正利、玉置尚徳、二神泰基
2. 発表標題 白麹菌における推定メチルトランスフェラーゼLaeAによるクエン酸生産制御機構の解析
3. 学会等名 平成31年度日本醸造学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 二神泰基
2. 発表標題 焼酎麹菌のクエン酸高生産機構
3. 学会等名 令和元年度清酒酵母・麹研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口正晃、門岡千尋、奥津果優、吉崎由美子、高峯和則、後藤正利、玉置尚徳、二神泰基.
2. 発表標題 白麹菌Aspergillus kawachiiにおける -アミラーゼAmyBの機能解析
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 門岡千尋、中村恵理、池田萌、森一樹、奥津果優、吉崎由美子、高峯和則、後藤正利、玉置尚徳、二神泰基
2. 発表標題 白麹菌においてLaeAはクエン酸排出輸送体遺伝子の発現を制御する
3. 学会等名 第43回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計8件

1. 著者名 二神 泰基、門岡 千尋、後藤 正利、玉置 尚徳	4. 発行年 2021年
2. 出版社 日本醸造協会	5. 総ページ数 9
3. 書名 日本醸造協会誌	

1. 著者名 二神 泰基、門岡 千尋、後藤 正利、玉置 尚徳	4. 発行年 2021年
2. 出版社 日本農芸化学会	5. 総ページ数 6
3. 書名 化学と生物	

1. 著者名 二神 泰基	4. 発行年 2021年
2. 出版社 秋田今野商店	5. 総ページ数 7
3. 書名 温古知新	

1. 著者名 二神 泰基、玉置 尚徳	4. 発行年 2021年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 5
3. 書名 生物の科学 遺伝	

1. 著者名 二神 泰基	4. 発行年 2021年
2. 出版社 日本生物工学会	5. 総ページ数 1
3. 書名 生物工学会誌	

1. 著者名 二神 泰基、後藤 正利	4. 発行年 2022年
2. 出版社 大阪工研協会	5. 総ページ数 9
3. 書名 科学と工業	

1. 著者名 二神泰基、門岡千尋	4. 発行年 2020年
2. 出版社 (一財)バイオインダストリー協会	5. 総ページ数 4
3. 書名 バイオサイエンスとインダストリー	

1. 著者名 二神泰基、後藤正利	4. 発行年 2020年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 2
3. 書名 アグリバイオ	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>麹菌のクエン酸生成機構の解明  <a href="https://ace1.agri.kagoshima-u.ac.jp/shochu/brewing/research.html#cont03">https://ace1.agri.kagoshima-u.ac.jp/shochu/brewing/research.html#cont03</a></p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	玉置 尚徳  (TAMAKI Hisanori)  (20212045)	鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・教授    (17701)	
研究分担者	後藤 正利  (GOTO Masatoshi)  (90274521)	佐賀大学・農学部・教授    (17201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関