

# 麹菌のクエン酸生産能力を決定する推定クエン酸輸送体 CitT の解析

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

## 研究の目的

焼酎製造には、主に黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* とそのアルビノ変異体である白麹菌 *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* が用いられている。黒麹菌と白麹菌は、 $\alpha$ -アミラーゼやグルコアミラーゼなどの糖質加水分解酵素に加えて、クエン酸を高生産する性質をもつ。焼酎造りでは、クエン酸はもろみの pH を下げて雑菌汚染を防ぐ重要な役割がある。このクエン酸を高生産する能力は、清酒、味噌、醤油などの製造に使用される黄麹菌 *Aspergillus oryzae* や醤油麹菌 *Aspergillus sojae* には見られないものであり、黒麹菌と白麹菌に特徴的な性質である。本研究では麹菌のクエン酸生産能力を決定付ける因子について解明することを目的として、白麹菌と黄麹菌においてクエン酸輸送体 CexA（研究題目では、CitT）の機能ならびに遺伝子発現の制御機構を解析した。

## 方法

白麹菌の *cexA* (AKAW\_07989) を *AkcexA* とした。また、黄麹菌には *cexA* が 2 つ存在しており (AO090009000645 と AO090023000271)、それぞれ *AocexA* と *AocexB* とした。白麹菌において、*AkcexA* 破壊株と *tefA* プロモーターによる *AkcexA* 過剰発現株を構築した。また、黄麹菌において *amyB* プロモーターによる *AkcexA*、*AocexA*、*AocexB* の過剰発現株を構築した。これらの菌株を用いて米麹を造り、クエン酸生産量を HPLC により測定した。また、米麹に含まれる菌体量を核酸法により推定し、推定菌体重量あたりのクエン酸生産量として評価した。また、黄麹菌ならびに、その *AkcexA* 過剰発現株の細胞内代謝物のメタボローム解析を CE-MS により行った。

白麹菌において推定メチルトランスフェラーゼをコードする *laeA* を破壊するとクエン酸生産が劇的に低下した原因を調べる過程で、*AkcexA* 遺伝子の発現が顕著に低下していることを見出していた。そこで、白麹菌の *laeA* 破壊株において *AkcexA* の強制発現を *gpdA* プロモーターにより行い、クエン酸生産能に及ぼす影響を評価した。また、抗メチル化ヒストン抗体を用いたクロマチン免疫沈降ならびに定量 PCR (ChIP-qPCR) により、*AkcexA* 遺伝子のプロモーター領域のクロマチン構造に *LaeA* が及ぼす影響を解析した。

## 結果

### 1. 白麹菌と黄麹菌におけるクエン酸輸送体 CexA の機能解析

クエン酸高生産には、細胞外へのクエン酸の排出が重要であると指摘されており、

クロカビ *Aspergillus niger* においてクエン酸輸送体 CexA (Citrate exporter protein A) が報告された<sup>1,2)</sup>。そこで、麹菌のクエン酸生産能力とクエン酸輸送体 CexA との関連性を解析した。まず、白麹菌の *AkcexA* 破壊株のクエン酸生産量はコントロール株の約 2.3%にまで減少したことから、白麹菌において AkCexA は主要なクエン酸輸送体であることが示唆された<sup>3)</sup>。また、白麹菌における *AkcexA* 過剰発現株のクエン酸生産量はコントロール株と比べて約 2.6 倍に増加した。このことから、白麹菌においてクエン酸の排出プロセスは律速要因であることが示唆された。次に、黄麹菌を宿主として *cexA* を高発現させることでクエン酸生産能が向上するかどうかを検討した。黄麹菌における *AkcexA* 高発現株は、白麹菌と同程度のクエン酸生産能を示した。また、黄麹菌由来の *AocexA* あるいは *AocexB* の高発現株も白麹菌の半分程度のクエン酸生産能を示した。これらの結果から、CexA は麹菌のクエン酸生産能を規定する重要な因子であることが示唆された。さらに、細胞内の代謝物に CexA の発現が及ぼす影響を調べた。その結果、白麹菌の *AkcexA* 破壊株では細胞内のクエン酸濃度は低下し、黄麹菌の *AkcexA*、*AocexA*、*AocexB* 高発現株では細胞内のクエン酸濃度は上昇した。これらの結果から、CexA の発現は細胞外だけでなく、細胞内におけるクエン酸の蓄積も促進することが明らかになった。

## 2. 白麹菌におけるクエン酸輸送体遺伝子の発現制御機構

*A. niger* において、推定メチルトランスフェラーゼをコードする *laeA* の破壊がクエン酸生産不全を引き起こすことが報告されていたが、その要因は不明であった<sup>4)</sup>。白麹菌において *laeA* を破壊すると、同様にクエン酸分泌生産能が顕著に低下した<sup>5)</sup>。LaeA は、ヒストンのメチル化修飾に関与するエピジェネティックな制御因子として知られている。そこで、白麹菌における *laeA* 破壊による遺伝子発現変動を Cap Analysis of Gene Expression (CAGE) 法により解析した。その結果、白麹菌の *laeA* 破壊株において、*AkcexA* 遺伝子の発現が顕著に低下したことを見出した。そこで、*laeA* 破壊株において、LaeA の制御化にない *gpdA* プロモーターにより *cexA* を強制発現させた結果、クエン酸生産能がコントロール株と同程度まで回復した。次に、LaeA に依存した *AkcexA* のプロモーター領域のヒストン修飾を明らかにするため、コントロール株と *laeA* 破壊株において、抗ヒストン H3 抗体、抗ヒストン H3K4 me3 抗体、抗ヒストン 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、H3K9 me3 はヘテロクロマチン領域の指標とした。その結果、*AkcexA* のプロモーター領域のヒストン H3 の占有率はコントロール株と *laeA* 破壊株において違いは認められなかった。一方、*laeA* 破壊株の H3K4 me3 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、H3K9 me3 占有率はコントロール株と比較して上昇していた。以上の結果より、LaeA はヒストン修飾を介して白麹菌の *AkcexA* のプロモーター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、*AkcexA* の発現を制御することが示唆された。

## 結論

黄麹菌において白麹菌由来のクエン酸輸送体遺伝子 *AkcexA* を過剰発現させることにより、黄麹菌がクエン酸高分泌生産能を獲得した<sup>3)</sup>。この結果から、*CexA* はクエン酸の生産能力を決定付ける因子であると考えられた。また、白麹菌において、*AkcexA* 遺伝子の発現は推定ヒストンメチルトランスフェラーゼ *LaeA* によるエピジェネティックな制御を受けることが明らかになった<sup>5)</sup>。これらの知見は、麹菌によるクエン酸生産量を制御する技術の開発などに役立つと期待される。

## 文献

- 1) Odoni, D. I. *et al.* (2019) *Aspergillus niger* citrate exporter revealed by comparison of two alternative citrate producing conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* **366**: fnz071.
- 2) Steiger, M. G., Rassinger, A., Mattanovich, D., Sauer, M. (2019) Engineering of the citrate exporter protein enables high citric acid production in *Aspergillus niger*. *Metab. Eng.* **52**: 224-231.
- 3) Nakamura, E. *et al.* (2020) Citrate exporter enhances both extracellular and intracellular citric acid accumulation in the koji fungi *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* and *Aspergillus oryzae*. *J. Biosci. Bioeng.* doi: 10.1016/j.jbiosc.2020.09.002 (published online)
- 4) Niu, J. *et al.* (2015) 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)* **6**: 193-204.
- 5) Kadooka, C. *et al.* (2020) *LaeA* controls citric acid production through regulation of the citrate exporter-encoding *cexA* gene in *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **86**: e01950-19.