

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月1日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009-2011

課題番号：21780078

研究課題名（和文）

清酒醸造時酵母ミトコンドリアにおける物質代謝の解析

研究課題名（英文）

Analysis of metabolism of substances within mitochondria of sake yeast during sake brewing

研究代表者

北垣 浩志 (KITAGAKI HIROSHI)

佐賀大学・農学部・准教授

研究者番号：70372208

研究成果の概要（和文）：

酸素のほとんどない清酒醸造における酵母ミトコンドリアの役割はこれまで研究されな
いできた。しかし申請者の研究により清酒醸造時の酵母ミトコンドリアの構造や役割が初
めて明らかになった。本研究では、清酒醸造時の物質代謝に酵母ミトコンドリア輸送体が
役割を持っているかを調べるため、ミトコンドリア輸送体の遺伝子破壊株29個と高発現
株22個を作製し清酒を醸造した結果、多くの株で物質代謝が変化していたことから、ミ
トコンドリア輸送体が清酒醸造時の物質代謝に役割を持っており、ミトコンドリア輸送体
が清酒酵母育種のターゲットになると考えられた。その成果を基にピルビン酸のミトコン
ドリアへの輸送阻害剤 ethyl alpha-transcyanocinnamate 耐性株を分離するという手法で
ピルビン酸が低減した清酒酵母を育種した。育種した清酒酵母は工場スケールでピルビン
酸の低減を示した。

研究成果の概要（英文）：

Since industrial alcoholic fermentation is performed without oxygen, the structure and the role of yeast mitochondria during industrial alcoholic fermentation have not been studied. We have, for the first time, elucidated the structure and role of yeast mitochondria during sake brewing. In order to investigate if yeast mitochondria can be targets of breeding, 29 deletants of mitochondrial transporters and 22 mutants overexpressing mitochondrial transporters were constructed and sake brewed with the mutants were analyzed. It was elucidated that substances of sake brewed with the mutants were statistically significantly different from those of the parent strain, indicating that yeast mitochondrial transporters have a role in metabolism of substances during sake brewing. Based on the finding, sake yeast underproducing pyruvate was developed by isolating a sake yeast mutant resistant to an inhibitor of mitochondrial pyruvate transport, ethyl alpha-transcyanocinnamate. The developed strain exhibited pyruvate underproduction on a factors scale sake brewing.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|------|-----------|---------|-----------|
| 21年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 22年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 23年度 | 200,000 | 60,000 | 260,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：農芸化学

科研費の分科・細目：農学・農芸化学・応用微生物学

キーワード：清酒、ミトコンドリア、酵母、物質代謝、育種、ピルビン酸

1. 研究開始当初の背景

清酒醸造を始めとする産業的なアルコール発酵は酸素濃度が極めて低い環境で行われるため、清酒醸造における酵母ミトコンドリアの研究はこれまでほとんど行われてこなかった。これに対して本研究が初めて清酒醸造における酵母ミトコンドリアの構造を明らかにしたことから、ミトコンドリアが新たな育種・代謝制御のターゲットとして浮上しつつある。しかしこれまで清酒醸造中の酵母ミトコンドリアでどのような代謝が行われているかについての情報はなかった。

2. 研究の目的

ミトコンドリアを清酒酵母育種や代謝制御のターゲットとするための情報とするため、ミトコンドリア輸送体の遺伝子を清酒酵母で破壊及び高発現して清酒を仕込み、その代謝を調べることで清酒醸造中の酵母ミトコンドリアで物質代謝が起きているかを明らかにする。

3. 研究の方法

ミトコンドリア輸送体の遺伝子の破壊株 29 株及び高発現株 22 株を作成し、清酒を仕込んで有機酸、アミノ酸の代謝を解析した。

4. 研究成果

上記の多くの株で物質代謝に統計的に有意な差が認められた。この結果からミトコンドリア輸送体が清酒酵母育種のターゲットになることがわかったため、ピルビン酸のミトコンドリアへの輸送阻害剤への耐性を指標としてピルビン酸の低減した清酒酵母を育種し、工場スケールでピルビン酸の低減を示すことを明らかにした。

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 26 件)

1 Saori Motomura, Kenta Horie and Hiroshi Kitagaki*

Mitochondrial activity of sake brewery yeast affects malic and succinic acid production during alcoholic fermentation.

Journal of the Institute of Brewing, 118, 22-26 (2012)

2 Lahiru N. Jayakody, Kenta Horie, Nobuyuki Hayashi, and Hiroshi Kitagaki*

Improvement of tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to hot-compressed water-treated cellulose by expression of *ADHI*.

Applied Microbiology and Biotechnology,

94(1), 273-83 (2012)

3 平田みよ、浦野義崇、稲葉繁樹、北谷和之、岡崎俊朗、北垣浩志*

焼酎粕に含まれるスフィンゴ脂質の検出・半定量的評価とその由来の解析

日本醸造学会誌, 106, 848-853 (2011)

4 北垣浩志、古川壮一、井沢真吾

微生物の寄生・共生・オルガネラ研究から見える新たな発酵学の地平線

生物工学会誌, 89(11), 674 (2011)

5 Akao T, Yashiro I, Hosoyama A, Kitagaki

H, Horikawa H, Watanabe D, Akada R, Ando Y, Harashima S, Inoue T, Inoue Y,

Kajiwara S, Kitamoto K, Kitamoto N, Kobayashi O, Kuhara S, Masubuchi T,

Mizoguchi H, Nakao Y, Nakazato A, Namise M, Oba T, Ogata T, Ohta A, Sato M,

Shibasaki S, Takatsume Y, Tanimoto S, Tsuboi H, Nishimura A, Yoda K, Ishikawa

T, Iwashita K, Fujita N, Shimoi H. Whole-Genome Sequencing of Sake Yeast

Saccharomyces cerevisiae Kyokai no. 7.

DNA Research, 18(6):423-34 (2011)

6 Rani Agustina Wulandari, Natsumi Haraguchi, Satomi Nakano, Yoshirou Furukawa,

Takashi Tanaka, Isao Kouno, Hiroshi Kitagaki and Kanji Ishimaru.

Teadenols biotransformed from tea catechins.

Japanese Journal of Food Chemistry and Safety, 18 (3), 137-142 (2011)

7 北垣浩志、古川壮一、渡邊泰祐

微生物の寄生・共生に着目した新しい物質生産技術の開発に向けて—特集に寄せて—

生物工学会誌, 89 (8), 460 (2011)

8 北垣浩志*

ミトコンドリア輸送に着目したピルビン酸・ α -アセト乳酸低減清酒酵母の育種とその実用化・技術移転

生物工学会誌, 89 (8), 461-464 (2011)

9 平田みよ、元村沙織、佐々木真、堀江健太、大場孝宏、柘植圭介、吉村臣史、小金丸和義、

北垣浩志*

ピルビン酸のミトコンドリア輸送阻害剤耐性酵母の小規模及び中規模パイロットスケールでの低アルコール清酒醸造特性

日本醸造学会誌, 106 (5), 323-331 (2011)

10 佐々木真、大場孝宏、末永光、稲橋正明、佐藤真佐恵、鶴田裕美、小林元太、柘植圭介、吉村臣史、小金丸和義、北垣浩志*
吟醸酒製造用清酒酵母からのピルビン酸低生産株の育種と実製造でのピルビン酸および α -アセト乳酸の低減
生物工学会誌, 89 (5), 222-227 (2011)

11 Lahiru N. Jayakody, Nobuyuki Hayashi*, and Hiroshi Kitagaki*
Identification of glycolaldehyde as the key inhibitor of bioethanol fermentation by yeast and genome-wide analysis of its toxicity.
Biotechnology Letters, 33(2), 285-92. (2011)

12 加藤拓、浪瀬政宏、北垣浩志、赤尾健、下飯仁
清酒酵母の醸造特性の QTL 解析
生物工学会誌, 89(2), 66 (2011)

13 荒木義雄、呉洪、北垣浩志、赤尾健、高木博史、下飯仁
エタノールストレスは *Saccharomyces cerevisiae* においてカルシウムイオンを介してカルシニューリン/Crz1 経路を活性化
生物工学会誌, 89, 2, 68 (2011)

14 Takahiro Oba, Hikaru Suenaga, Shunichi Nakayama, Shinji Mitsuiki, Hiroshi Kitagaki, Kosuke Tashiro, and Satoru Kuhara
Properties of a high malic acid-producing strains of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from sake mash
Bioscience, *Biotechnology*, and *Biochemistry*, 75(10), 2025-9 (2011)

15 北垣浩志 他
若手アカデミー設置について
日本学術会議・若手アカデミー委員会 若手アカデミー活動検討分科会、査読無、日本学術会議、1, 2011, p1-23

16 Kenta Horie, Takahiro Oba, Saori Motomura, Atsuko Isogai, Takashi Yoshimura, Keisuke Tsuge, Kazuyoshi Koganemaru, Genta Kobayashi and Hiroshi Kitagaki*
Breeding of a low pyruvate-producing sake yeast by isolation of a mutant resistant to ethyl alpha-transcyanocinnamate, an inhibitor of mitochondrial pyruvate transport.
Bioscience, *Biotechnology*, and

Biochemistry, 74 (4), 843-847 (2010)

17 北垣浩志
ミトコンドリア輸送阻害剤耐性株取得によるピルビン酸低減清酒酵母の育種
日本醸造協会誌, 105(9), 560-567 (2010)

18 北垣浩志
ミトコンドリア輸送に着目したピルビン酸低減酵母育種
バイオサイエンスとインダストリー, 68, 126-128 (2010)

19 北垣浩志
低アルコール清酒醸造のための技術開発
生物工学会誌, 88(2), 79 (2010)

20 Hong Wu, Tomoko Watanabe, Yoshio Araki, Hiroshi Kitagaki, Takeshi Akao, Hiroshi Takagi and Hitoshi Shimoi
Disruption of ubiquitin-related genes in laboratory yeast strains enhances ethanol production during sake brewing.
Journal of Bioscience and Bioengineering, 107(6):636-40 (2009)

21 Hiroshi Kitagaki, Lauren Cowart, Nabil Matmati, David Montefusco, Jason Gandy, Silvia Vaena de Avalos, Sergei Novgorodov, Jim Zheng, Lina Obeid, Yusuf Hannun.
ISC1-dependent metabolic adaptation reveals an indispensable role for mitochondria in induction of nuclear genes during the diauxic shift in *S. cerevisiae*.
Journal of Biological Chemistry, 284(16), 10818-30 (2009)

22 Nabil Matmati, Hiroshi Kitagaki, David Montefusco, Bidyut K Mohanty, Yusuf Hannun
Hydroxyurea sensitivity reveals a role for ISC1 in the regulation of G2/M.
Journal of Biological Chemistry, 284(13):8241-6 (2009)

23 Hiroshi Kitagaki*
Mitochondrial-morphology-targeted breeding of industrial yeast strains for alcohol fermentation.
Biotechnology and Applied Biochemistry, 53(3), 145-53 (2009).

24 北垣浩志
清酒醸造における酵母ミトコンドリアの役割の解析とその育種への応用
生物工学誌, 87, 66-71 (2009)

25 Taku Kato, Masahiro Namise, Hiroshi Kitagaki, Takeshi Akao, Hitoshi Shimoi

QTL mapping of sake brewing characteristics of yeast.

Journal of Bioscience and Bioengineering, 107(4):383-93 (2009)

26 Yoshio Araki, Hong Wu, Hiroshi Kitagaki, Takeshi Akao, Hiroshi Takagi and Hitoshi Shimoi

Ethanol stress stimulates the Ca²⁺-mediated calcineurin/Crz1 pathway in *Saccharomyces cerevisiae*.

Journal of Bioscience and Bioengineering, 107(1):1-6 (2009)

[学会発表] (計 44 件)

1 北垣浩志 :” 醸造微生物の生存戦略メカニズム～新しく見えてきたその素顔とは一おわりに” 日本農芸化学会大会. (20130325) 京都女子大学

2 北垣浩志 :” 発酵呼吸転換における酵母ミトコンドリアの新機能” 日本農芸化学会大会(20120325) 京都女子大学 (招待講演)

3 北垣浩志 :” 焼酎粕からのスフィンゴ脂質の抽出及び発酵による機能性食品の製造について” 佐賀機能性・健康食品等研究シーズ交流会. (20120305) 都道府県会館 (招待講演)

4 北垣浩志 :” ミトコンドリアをターゲットとした清酒酵母の育種とその実用化” バイオインダストリー協会・発酵と代謝研究会. (20120229) バイオインダストリー協会 (招待講演)

5 北垣浩志 :” 発酵セラミドの発見と機能性食品への応用” 佐賀県ベンチャー交流ネットワーク第 4 回例会. (20120221) ホテルマリターレ創生 (招待講演)

6 北垣浩志 :” 発酵技術を活用した地域との連携について” さが機能性・健康食品開発拠点「徐福フロンティアラボ」ミニシンポジウム in 小城. (20110929) 小城市民会館 (招待講演)

7 北垣浩志 :” ミトコンドリア輸送をターゲットとした低ピルビン酸酵母の育種技術” イノベーション・ジャパン 2011. (20110921) 幕張メッセ (招待講演)

8 北垣浩志 :” ワークショップ (寄生・共生・

オルガネラ研究から見える新たな発酵学の地平線) はじめに” 日本生物工学会大会. (20110926) 東京農工大学 (基調講演)

9 北垣浩志 :” ミトコンドリア輸送をターゲットとしたピルビン酸低減酵母育種” 日本生物工学会大会(20110926). 東京農工大学

10 北垣浩志 :” 嫌気呼吸・酸素呼吸間の移行にミトコンドリアが果たす役割について” 第 15 回酸素ダイナミクス研究会. (20110915) 佐賀大学 (招待講演)

11 北垣浩志 :” 醸造酵母育種の最新潮流” 日本醸友会沖縄県支部講演会. (20110627) 沖縄県酒造会館 (招待講演)

12 北垣浩志 :” 日本国の伝統酒・日本酒の歴史と技術、研究” 第 100 回記念 佐賀ふうどフォーラム「東アジアの食と文化」. (20110606) グランデはがくれ (招待講演)

13 北垣浩志 :” 焼酎粕の機能性” SAGA テクノ 2011 初夏～産学官連携技術交流会～. (20110606) グランデはがくれ (招待講演)

14 北垣浩志 :” 新たなスパークリング清酒の製造法の開発” 九州地域バイオベンチャーフォーラム. (20110523) サガシティホテル (招待講演)

15 大場 孝宏, 末永 光, 中山 俊一, 満生 慎二, 北垣 浩志 :” 清酒もろみから分離したリンゴ酸高生産清酒酵母の特性” 日本生物工学会大会(20110926). 東京農工大学

16 平田 みよ, 浦野 義崇, 北谷 和之, 岡崎 俊朗, ビエラ, オベエド, ハナン, 北垣 浩志 :” 九州の焼酎かすから検出したスフィンゴ脂質の解析” 日本生物工学会大会. (20110926). 東京農工大学

17 徳永 直也, 福崎 久詩, 北垣 浩志 :” 焼酎酵母のミトコンドリアの可視化とその醸造過程における形態の解明” 日本生物工学会大会(20110926). 東京農工大学

18 Lahiru Jayakody, Kenta Horie, Nobuyuki Hayashi, Hiroshi Kitagaki :” Glycolaldehyde, a novel inhibitor of bioethanol production; comparison with other inhibitors and breeding of a resistant strain.” 日本生物工学会大会 (20110926). 東京農工大学

19 北垣浩志, 佐々木真, 佐藤三郎, 後藤潤, 七

田謙介, 柘植圭介, 吉村臣史: "低ピルビン酸清酒酵母の育種とそれを使ったスパークリング清酒の開発" 産学連携学会第9回大会. (20110616) アバンセ

20 北垣浩志, Lahiru N. Jayakody: "リグノセルロースの水熱処理で生成するグリコールアルデヒドの酵母発酵阻害メカニズム" アクアリシスフェーズ II 研究会. (20110310). 佐賀大学(招待講演)

21 北垣浩志: "沖縄から探る伝統的発酵における微生物の寄生・共生" 日本生物工学会研究部会シンポジウム. (20101203). 琉球大学(基調講演)

22 北垣浩志: "ミトコンドリア輸送に着目したピルビン酸低減酵母の育種方法" 日本生物工学会シンポジウム. (20101027). 宮崎シーガイア(招待講演)

23 北垣浩志: "バイオエタノールの基本と仕組み" 佐賀環境フォーラム. (20100624). 佐賀大学(招待講演)

24 北垣浩志: "佐賀の伝統食品の機能性" SAGA イノベーション道場. (20101022). 佐賀市アイスクエアビル(招待講演)

25 北垣浩志: "ミトコンドリアをターゲットとした酒類発酵酵母の育種の研究" バイオジャパン2010. (20100929). パシフィコ横浜(招待講演)

26 徳永直也, 堀江健太, 柘植圭介, 吉村臣史, 小金丸和義, 北垣浩志: "ミトコンドリア輸送阻害剤耐性清酒酵母で醸造した清酒のアミノ酸組成の解析" 日本農芸化学会大会. (20110326). (みなし開催)

27 Lahiru N. Jayakody, Kenta Horie, Nobuyuki Hayashi, Hiroshi Kitagaki: "Glycolaldehyde, a key novel inhibitor of bioethanol production: breeding of resistant strains." 日本農芸化学会大会. (20110326). (みなし開催)

28 堀江健太, 柘植圭介, 鶴田裕美, 吉村臣史, 小金丸和義, 北垣浩志: "酵母ミトコンドリア輸送体は清酒醸造中の物質代謝に積極的な役割を持つ" 日本農芸化学会大会. (20110326). (みなし開催)

29 副島久義, 柘植圭介, 吉村臣史, 小金丸和義, 北垣浩志: "エタノール耐性と栄養要求性を組み合わせたチロソール高生産清酒酵母の育種" 日本農芸化学会大会.

(20110326). (みなし開催)

30 平田みよ, 北谷和之, 岡崎俊朗, L. M. Obeid, Y. A. Hannun, 北垣浩志: "九州の焼酎かすからのスフィンゴ脂質の検出・定量と解析" 日本農芸化学会大会. (20110326). (みなし開催)

31 元村沙織, 平田みよ, 佐々木真, 堀江健太, 大場孝宏, 柘植圭介, 吉村臣史, 小金丸和義, 北垣浩志: "ミトコンドリア輸送阻害剤耐性清酒酵母を使って実地醸造した低アルコール清酒の香味解析" 日本生物工学会九州支部大会. (20101203). 琉球大学

32 元村沙織, 北垣浩志: "清酒酵母ミトコンドリアの呼吸・発酵転換時の形態変化とその意義の解析" 日本生物工学会大会. (20101026). 宮崎シーガイア

33 佐々木真, 堀江健太, 柘植圭介, 吉村臣史, 小金丸和義, 大場孝宏, 北垣浩志: "吟醸酵母からのピルビン酸ミトコンドリア輸送阻害剤耐性株の分離" 日本生物工学会大会. (20101026). 宮崎シーガイア

34 Lahiru JAYAKODY, Kenta HORIE, Nobuyuki HAYASHI, Hiroshi KITAGAKI: "Glycolaldehyde inhibits yeast ethanol fermentation" 日本生物工学会大会. (20101026). 宮崎シーガイア

35 平田みよ, 元村沙織, 北垣浩志: "抗酸性の高い小豆発泡酒の開発" 日本生物工学会大会. (20101026). 宮崎シーガイア

36 佐々木真, 平田みよ, 元村沙織, 堀江健太, 北垣浩志: "ミトコンドリア輸送に着目し育種した低ピルビン酸酵母の改変と清酒醸造特性" 日本農芸化学会西日本支部大会. (20100926). 崇城大学

37 元村沙織, 北垣浩志: "拡大培養時の酵母ミトコンドリアの形態の解析とその代謝への意義の解析" 日本醸造学会若手会. (20100915). 北とぴあ

38 北垣浩志: "九州の農産物を使った酒類の機能性と新たな商品開発" 第2回機能性天然素材研究会. (20100201). 産業技術総合研究所九州センター

39 Hiroshi Kitagaki: "The traditional procedures for brewing grain vinegar and Kurozu in Japan and their functionalities" Vinegar and Health International Summit Forum. (20091107). 中国・北京・京都信苑飯店

40 北垣浩志：“低アルコール清酒製造用酵母の開発について”平成21年度第3回食品技術研究会・技術セミナー。(20090805). 佐賀県酒造組合

41 北垣浩志：“清酒醸造における酵母ミトコンドリアのさまざまな役割とその実用育種への応用”酵母細胞研究会。(20090703). サッポロビール千葉工場

42 堀江健太、北垣浩志：“ミトコンドリア輸送阻害剤耐性によるピルビン酸低生産酵母の自然育種”日本醸造学会。(20090917). 北とぴあ

43 堀江健太、磯谷敦子、西田郁久、高木博史、北垣浩志：“清酒醸造における酵母ミトコンドリア輸送体の役割の解析”日本生物工学会。(20090924). 名古屋大学

44 北垣浩志、Lauren Cowart, Nabil Matmati, David Montefusco, Jason Gandy, Silvin Vaena de Avalos, Sergei Novgorodov, Jim Zheng, Lina Obeid, Yusuf Hannun：“酵母ミトコンドリアの機能は発酵から呼吸への転換を制御する”日本生物工学会。(20090924). 名古屋大学

[図書] (計1件)

1 北垣浩志*

ミトコンドリア輸送をターゲットとした低ピルビン酸清酒酵母の育種とその実用化

CMC 出版、発酵・醸造食品の最新技術と機能性Ⅱ, 1-10 (2011)

[産業財産権]

○出願状況 (計5件)

名称：ピルビン酸低生産酵母の育種方法

発明者：北垣浩志

権利者：佐賀大学

種類：特願

番号：2010-111263

出願年月日：2010年5月13日

国内外の別：国内

名称：発泡酒の製造方法

発明者：北垣浩志、平田みよ

権利者：佐賀大学

種類：特願

番号：2010-141601

出願年月日：2010年6月22日

国内外の別：国内

名称：チロソール高生産性酵母変異株及び当該酵母変異株を用いた発酵アルコール飲料の製造方法

発明者：北垣浩志

権利者：佐賀大学

種類：特願

番号：2010-237519

出願年月日：2010年10月22日

国内外の別：国内

名称：グリコールアルデヒドに耐性を示す酵母

発明者：北垣浩志

権利者：佐賀大学

種類：特願

番号：2011-18441

出願年月日：2011年1月31日

国内外の別：国内

名称：スフィンゴ脂質の製造方法

発明者：北垣浩志、岡崎俊朗、北谷和之

権利者：佐賀大学、鳥取大学

種類：特願

番号：2012-90774

出願年月日：2012年4月12日

国内外の別：国内

○取得状況 (計1件)

名称：酵母のリンゴ酸生産性を向上させる方法

発明者：北垣浩志、下飯仁、三上重明

権利者：独立行政法人酒類総合研究所

種類：特許

番号：5201622

取得年月日：2013年2月22日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://seisansystem.ag.saga-u.ac.jp/kitagaki.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北垣 浩志 (KITAGAKI HIROSHI)

佐賀大学・農学部・准教授

研究者番号：70372208

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：