

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07363

研究課題名(和文)メタボロームのずれをミトコンドリア寄与で補正

研究課題名(英文)Reanalysis of the metabolome data by considering the mitochondrial status

研究代表者

北垣 浩志 (Kitagaki, Hiroshi)

佐賀大学・農学部・教授

研究者番号：70372208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：発酵産業で使われる酵母をはじめとする酵母は発酵が始まると極端な低酸素にさらされるため、ミトコンドリアが発達せず、その代謝は十分に調べられてこなかった。しかし我々はミトコンドリアも発酵初期には残存し、代謝に影響を与えていることを明らかにしたことから、ミトコンドリア活性が発酵中の酵母の代謝に与える影響を調べ、既存のメタボローム解析結果も再解釈できるようなシステムの構築を目指した。

呼吸と発酵と中間型の酵母を用意し、そのメタボローム解析結果を解析した結果、メタボローム解析結果からPLS回帰により統計的に有意にその酵母が呼吸状態にあるか発酵状態にあるかを予測できた。

研究成果の概要(英文)：Fermentation microbes such as yeast are exposed to extreme anaerobiosis during fermentation. Since mitochondria shrink in such environments, the role of mitochondria in the metabolism of yeast has not been studied in detail. However, this notion has hampered biosynthesis of complex substances that are related to mitochondrial metabolism.

In this study, we prepared respirative, fermentative and middle status yeasts, and studied their metabolome. From the metabolome data, we could construct a PLS regression equation to exactly predict the status of yeasts with high statistical significance. This knowledge will enable prediction of the respirative status of yeasts whose metabolomes were analyzed.

研究分野：応用微生物学

キーワード：メタボローム 発酵 酵母 ミトコンドリア

## 1. 研究開始当初の背景

近年、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* をはじめとした産業微生物の代謝経路をメタボローム解析を用いて明らかにし、有用物質の高生産に活用するための研究が盛んにおこなわれている。

一方、出芽酵母は Crabtree 効果陽性であるため、呼吸の有無、すなわちミトコンドリア活性の高低でその代謝が大きく変わる。例えば遺伝子発現で見ると、全ゲノムの約3分の1が呼吸と発酵で異なることがわかっている。従ってミトコンドリア活性が代謝に与える影響は、当然考慮する必要があった。

しかし、これまでの出芽酵母のメタボローム解析において、ミトコンドリアの寄与は十分に明らかになっていなかった。そのため、メタボローム解析結果は実際にはミトコンドリアの活性に左右されていたと考えられるが、どの成分がどの程度左右されるかについての情報は不明瞭であった。

またミトコンドリアを介した有用物質の生産の報告もあるが、その高生産のためのミトコンドリアの条件も明らかではなかった。

そこでミトコンドリアの活性を変えたときにメタボローム解析がどのように変わるかを明らかにし、これまでのメタボローム解析結果をミトコンドリア活性の観点から解釈できるようにする。

## 2. 研究の目的

ミトコンドリアの活性が変動した条件(酸素通気濃度、株の遺伝的なミトコンドリア活性等)でメタボローム解析を行い、ミトコンドリアの寄与の有無でメタボローム解析結果がどのように変わるかを解析する。

具体的には、ミトコンドリア活性の高低で変わる代謝物質を見つけ、その物質がミトコンドリア活性にどの程度寄与しているかを明らかにする。

さらにミトコンドリア活性に対してメタボローム解析で解析した代謝物質の濃度をPLS解析で投影し、既存の代謝物質濃度から使われた酵母のミトコンドリア活性を推定する式を構築する。

## 3. 研究の方法

振盪培養速度や培地上層への流動パラフィンの添加などにより、酸素通気濃度を変えた培養条件を設定したり、遺伝的にミトコンドリア活性が下がった株(清酒酵母)とミトコンドリア活性が通常の株(実験室酵母、焼酎酵母)を使って培養し、培養物を採取した。

培養物の親水性画分を採取したのち、メトキシアミン塩酸塩及びMSTFAを用いて誘導体化し、GC-MS及びGC-FIDを用いて解析した。

それらのメタボローム解析結果を、統計ソフトSIMCA-Pを用いて解析し、ミトコンドリアの活性に対してPLS回帰し、VIPスコアの高い物質を同定した。

またこれらによりそれぞれの代謝物質か

らミトコンドリア活性を推定する式を構築した。

## 4. 研究成果

メタボローム解析結果をPLS回帰することで、ミトコンドリアの活性によって変わる、すなわちPLS解析におけるVIPスコアが有意に高い物質(グルタミン酸、バリンなど)を特定することができた。

さらに、代謝物質から、その状態の酵母のミトコンドリア活性を推定する式を構築することができた。構築した式のR<sup>2</sup>値は92.3、Q<sup>2</sup>値は62.8、RMSEE値は0.273、RMSEP値は0.263であり、信頼性の高い予測式を構築することができた。

これらの研究成果によって、培養したときの酵母のミトコンドリア活性の情報がなくても、既に得られているメタボローム解析結果から使われた酵母のミトコンドリア活性を推定できるようになったと言える。

さらに、既存のメタボロームデータについても、構築した式に代謝物濃度を入力するだけで、その使った酵母のミトコンドリア活性を推定できるようになったと言える。

これらの研究成果により、代謝物から酵母のミトコンドリア活性を推定するシステムができたと考えている。

## 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 8件)

1. Ferdouse J, Yamamoto Y, Taguchi S, Yoshizaki Y, Takamine K, Kitagaki H\*. Glycosylceramide modifies the flavor and metabolic characteristics of sake yeast. PeerJ6:e4768 <https://doi.org/10.7717/peerj.4768> (2018)
2. Ferdouse J, Miyagawa M, Hirano M, Kitajima Y, Inaba S and Kitagaki H\*. A new method for determining the mycelial weight of the koji-mold *Aspergillus oryzae* by measuring its glycosylceramide content Journal of General and Applied Microbiology, in press (2018)
3. 北垣浩志 日本の伝統発酵食品の健康機能性解明に向けた取り組み 化学と生物, in press (2018)
4. 北垣浩志 和食の共通要素、麹セラミドの腸内細菌改善作用

生物工学会誌, in press (2018)

5. **北垣浩志**

日本酒酵母における異数染色体の生成とその醸造特性への寄与  
生化学, in press (2018)

6. Kadowaki M, Fujimaru Y, Taguchi S, Ferdouse J, Sawada K, Kimura Y, Terasawa Y, Agrimi G, Anai T, Noguchi H, Toyoda A, Fujiyama A, Akao T, and **Kitagaki H\***

Chromosomal aneuploidy improves brewing characteristics of sake yeast.  
Applied and Environmental Microbiology, 83, 24, pii: e01620-17 (2017)

7. Jayakody LN, Ferdouse J, Hayashi N, **Kitagaki H\***

Identification and detoxification of glycolaldehyde, an unattended bioethanol fermentation inhibitor.  
Critical Reviews in Biotechnology, 37(2):177-189 (2017). doi: 10.3109/07388551.2015.1128877.

8. 阪本真由子、酒谷真以、Jannatul Ferdouse、浜島浩史、松永陽香、柘植圭介、西向めぐみ、柳田晃良、永尾晃治、光武進、**北垣浩志\***

麹で造られる醸造食品のグリコシルセラミド含量定量手法の検討とそれを用いた定量  
日本醸造学会誌、112, 9, 655-662 (2017).

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 門脇真史、藤原広樹、藤丸裕貴、山本裕貴、吉崎成洋、善本裕之、**北垣浩志**  
流加培養条件下における酵母のコハク酸生成メカニズムの解析  
2018 年日本農芸化学会大会

2. 藤原広樹、吉崎成洋、**北垣浩志**、善本裕之、  
流加培養した醸造用酵母の特性解析および醸造特性改善  
2018 年日本農芸化学会大会

3. 藤川彩美、阪本真由子、許志豪、**北垣浩志**、  
麹脂質の腸内細菌による代謝分解物質の解析  
2018 年日本農芸化学会大会

4. Fujimaru Y, Kadowaki M, Taguchi S, Sakamoto M, Sakatani M, Fujikawa A and **Kitagaki H.**

Chromosomal aneuploidy improves brewing characteristics of sake yeast  
2017, International Conference on Applied Microbiology and Beneficial Microbes  
ポスター受賞

5. 藤丸裕貴、門脇真史、田口誠我、澤田和敬、赤尾健、野口英樹、豊田敦、藤山秋佐夫、**北垣浩志**、

清酒酵母から自然に得られた染色体数の異なる一倍体株の代謝解析によるミトコンドリア活性の推定  
2017 年日本生物工学会大会トピックスに選定

6. 藤丸裕貴、門脇真史、田口誠我、阪本真由子、野口英樹、豊田敦、藤山秋佐夫、赤尾健、**北垣浩志**、

染色体数の異なる清酒酵母の作出とその醸造特性 遺伝子組換えを使わない染色体操作技術  
2017 年日本生物工学会大会

7. 阪本真由子、藤川彩美、酒谷真以、柘植圭介、**北垣浩志**、

甘酒に含まれる脂質成分のマクロファージへの作用解析  
2017 年日本生物工学会大会

〔図書〕(計 5 件)

1. **北垣浩志**監修、早川純子絵  
こうじ菌  
農文協, 1-32

2. **北垣浩志**  
食べる生甘酒  
壮快、10, 136-137 (2017)

3. 阪本真由子、藤丸裕貴、**北垣浩志**  
発酵と醸造のいろは-麹菌  
NTS 出版, 47-52 (2017)

4. **北垣浩志**  
麹セラミドが独自の健康効果を発揮  
現代農業、6, 338-341 (2017)

5. **北垣浩志**  
こうじ菌と和食の力-微生物の共生が発酵食品を造る  
現代農業、5, 326-329 (2017)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：麹菌菌体量の測定方法および測定用キットならびに麹菌菌体量を定量させるためのプログラム  
発明者：北垣浩志  
権利者：佐賀大学  
種類：公開  
番号：特開 2018-77137  
出願年月日：平成 28 年 11 月 9 日  
国内外の別： 国内

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://seisansystem.ag.saga-u.ac.jp/>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者  
北垣 浩志 (KITAGAKI, Hiroshi)  
佐賀大学・農学部・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：

(4)研究協力者  
( )