

様 式 F - 7 - 1

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）実施状況報告書（研究実施状況報告書）（平成 28 年度）

1. 機関番号

1	4	6	0	3
---	---	---	---	---

 2. 研究機関名 奈良先端科学技術大学院大学

3. 研究種目名 若手研究(B) 4. 補助事業期間 平成 28 年度～平成 30 年度

5. 課題番号

1	6	K	1	8	6	7	6
---	---	---	---	---	---	---	---

6. 研究課題名 清酒酵母において見出されたTORシグナルを介した高発酵メカニズムの解明とその応用

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
3 0 5 2 7 1 4 8	ワタナベ ダイスケ 渡辺 大輔	バイオサイエンス研究科	助教

8. 研究分担者

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名

9. 研究実績の概要

TORシグナルが、出芽酵母におけるアルコール発酵調節の鍵因子であることを明らかにするために、発酵過程におけるTORC1活性の解析を行った。TORC1の主要な標的タンパク質の一つであるSch9pプロテインキナーゼのリン酸化を調べた結果、旺盛な発酵を示す発酵初期においてTORC1活性が最も高いことが明らかになった。また、実験室酵母との比較により、高発酵性を示す清酒酵母において、発酵初期のTORC1活性が顕著に高いことも見出した。以上の結果から、TORシグナルと発酵性の間に関連があり、清酒酵母ではTORC1活性の強化によって高い発酵性を獲得した可能性が示唆された。

次に、TORシグナルが発酵に及ぼす影響をより直接的に調べるために、発酵速度の解析を実施した。その結果、TORC1阻害剤であるラパマイシンによる処理や、TORC1に特異的な構成因子であるTco89pの欠損、TORC1の上流活性化因子として知られるGtr1/2pの欠損はいずれも発酵速度を低下させたのに対し、TORC1の活性型変異（TOR1(L2134M)）は発酵速度の最大値を有意に上昇させた。また、TORC1の下流因子の解析では、清酒酵母において機能が欠損しているRim15pプロテインキナーゼに加えて、アミノ酸の生合成を司る転写因子Gcn4p、アミノ酸の取込みを司る転写因子Gln3pおよびGat1pとNpr1pプロテインキナーゼが発酵の「ブレーキ」として働くのに対し、リボソームの生合成・タンパク質合成を正に制御する転写因子Sfp1pが発酵の「アクセル」として働くことを見出した。TORC1は、Rim15p、Gcn4p、Gln3p、Gat1p、Npr1pを阻害し、Sfp1pを活性化することが報告されており、「ブレーキ」の抑制と「アクセル」の促進を同時に遂行する発酵調節のマスターレギュレーターとして機能すると結論づけた。

10. キーワード

(1) TORシグナル	(2) TORC1	(3) アルコール発酵	(4) 清酒酵母
(5) Rim15p	(6) アミノ酸合成	(7) アミノ酸取込み	(8) タンパク質合成

11. 現在までの進捗状況

(区分)(2) おおむね順調に進展している。

(理由)

当初の計画通り、TORシグナルを介したアルコール発酵調節に関与する因子とその重要性を明らかにすることができた。本研究に着手する以前は、清酒酵母の研究を通してRim15pのみが主要な発酵の「ブレーキ」として同定されていたが、本年度はRim15pの上流阻害因子であるTORC1に加え、Rim15p以外の多数のTORC1下流因子が既知の機能(アミノ酸合成、アミノ酸取込み、タンパク質合成)とは異なる発酵調節に関わることを解明した点は特筆に値する。さらに、清酒酵母において新たに見出したTORC1の高活性は、清酒酵母の高発酵性を生み出した根源的な原因であると考えられる。したがって、本成果は長年にわたる醸造学上の謎(清酒酵母はなぜ発酵能が高いのか?)の解明に大きく貢献することが期待され、応用微生物学の観点からも重要な知見が得られたのではないかと考えられる。これまでの成果を国内学会等において発表したことに加え、特にRim15pを介した発酵調節メカニズムについて、原著論文1報、総説3報を執筆した。

12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

アルコール発酵調節メカニズムについては、本年度見出したTORC1関連の新規発酵調節因子による代謝への影響を明らかにする。特に、Rim15pの欠損がUDP-グルコースおよびこれを基質とする貯蔵性・構造的糖質の合成を抑制することで炭素代謝に直接的に作用し発酵を促進するのに対し、TORC1および新たに見出された因子はアミノ酸の合成、取込み、消費(タンパク質合成)に関連しており、細胞内のアミノ酸プールが発酵調節に関与するという新規な可能性が考えられる。このことから、今後は、細胞内代謝産物の解析を通して、炭素-窒素代謝のクロストーク調節を想定しながら解析を進めていく。

また、清酒酵母において、発酵の「ブレーキ」であるRim15pプロテインキナーゼ上の機能欠失変異(rim15(5055insA))が高発酵性の一因であることを、申請者らは以前に明らかにしている(Watanabe et al., Appl. Environ. Microbiol. (2016))。本年度の研究によって、Rim15p以外の複数の「ブレーキ」が見出されたことから、これらの「ブレーキ」をコードする遺伝子上に清酒酵母特異的な機能欠失変異が存在する可能性を想定し、解析を行う。中でも、GAT1遺伝子上にはすでに清酒酵母特異的な変異(gat1(72insTA))を発見している。本年度は主に各発酵調節因子の個別の役割について解析を行ったが、今後は発酵調節因子間の相互作用を調べることで、出芽酵母・清酒酵母における発酵調節の全体像解明に迫りたい。

(次年度使用額が生じた理由と使用計画)

(理由)

(使用計画)

(課題番号: 16K18676)

(注)・印刷に当たっては、A4判(縦長)・両面印刷すること。

13. 研究発表 (平成 28 年度の研究成果)

〔雑誌論文〕 計(4)件/うち査読付論文 計(3)件/うち国際共著 計(0)件/うちオープンアクセス 計(0)件

著者名		論文標題				
Watanabe D, Kaneko A, Sugimoto Y, Ohnuki S, Takagi H, Ohya Y		Promoter engineering of the <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIM15 gene for improvement of alcoholic fermentation rates under stress conditions.				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著	
Journal of Bioscience and Bioengineering	有	123	2017	183-189	-	
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)						
10.1016/j.jbiosc.2016.08.004						
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						

著者名		論文標題				
渡辺 大輔, 高木 博史		ここまでわかった! きょうかい酵母(清酒用)の高発酵力を生み出すRIM15変異遺伝子				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著	
日本醸造協会誌	有	110	2016	638-647	-	
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)						
なし						
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						

著者名		論文標題 【掲載確定】				
Watanabe D, Takagi H		Pleiotropic functions of the yeast Greatwall-family protein kinase Rim15p: a novel target for the control of alcoholic fermentation.				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著	
Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	有	in press	2017	-	-	
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)						
10.1080/09168451.2017.1295805						
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						

(課題番号: 16K18676)

(注)・印刷に当たっては、A4判(縦長)・両面印刷すること。

(3/7)

著 者 名		論 文 標 題 【掲載確定】				
渡辺 大輔, 高木 博史		お酒をつくる酵母 - ゲノムから解き明かす醸造特性のひみつ				
雑 誌 名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著	
生物の科学 遺伝	無	印刷中	2 0 1 7	-	-	
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)						
なし						
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						

〔学会発表〕 計(10)件/うち招待講演 計(3)件/うち国際学会 計(3)件

発 表 者 名	発 表 標 題	
渡辺 大輔	酵母における環境応答と代謝調節に関する分子遺伝学的研究とその応用	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
日本農芸化学会関西支部第495回講演会・ミニシンポジウム (招待講演)	2016年07月09日	大阪府立大学学術交流会館(堺市)

発 表 者 名	発 表 標 題	
渡辺 大輔	なぜ清酒酵母はアルコール発酵力が高いのか？	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
駒場談話会(招待講演)	2016年07月23日	東京大学駒場キャンパス(東京都目黒区)

発 表 者 名	発 表 標 題	
渡辺 大輔	新しい酵母の創成による発酵生産性・品質の向上を目指して	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
イノベーション・ジャパン2016(招待講演)	2016年08月25日～ 2016年08月26日	東京ビッグサイト(東京都江東区)

発表者名	発表標 題	
Watanabe D, Takagi H, Shimoi H	Mechanism of high alcoholic fermentation performance of sake yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
The 14th International Congress on Yeasts (ICY14) (国際学会)	2016年09月11日 ~ 2016年09月15日	Awaji, Hyogo (Japan)

発表者名	発表標 題	
Yoshioka N, Watanabe D, Takagi K, Sugimoto Y, Takagi H	Phosphate homeostasis as a novel regulatory mechanism of alcoholic fermentation by <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
The 14th International Congress on Yeasts (ICY14) (国際学会)	2016年09月11日 ~ 2016年09月15日	Awaji, Hyogo (Japan)

発表者名	発表標 題	
Ito M, Watanabe D, Sugimoto Y, Takahashi T, Takagi H	Physiological role of lactic acid bacteria in traditional sake brewed with sake yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
The 14th International Congress on Yeasts (ICY14) (国際学会)	2016年09月11日 ~ 2016年09月15日	Awaji, Hyogo (Japan)

発表者名	発表標 題	
渡辺 大輔, 金子 亜紀江, 杉本 幸子, 大貫 慎輔, 高木 博史, 大矢 禎一	ストレス環境におけるアルコール発酵力の改善を目指した酵母RIM15遺伝子のプロモーター改変	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第68回日本生物工学会大会	2016年09月28日 ~ 2016年09月30日	富山国際会議場 (富山県富山市)

発表者名	発表標題	
渡辺 大輔, 周 延, 陳 佳文, 水野 恵, 荒木 義雄, 杉本 幸子, 万 クン, 中沢 伸重, 赤尾 健, 下飯 仁, 水田 啓子, 前田 達哉, 高木 博史	清酒酵母におけるTORC1シグナリングとアルコール発酵の関連に関する研究	
学会等名	発表年月日	発表場所
平成28年度日本醸造学会大会	2016年10月19日 ~ 2016年10月20日	北とぴあ (東京都北区)

発表者名	発表標題	
吉岡 直哉, 渡辺 大輔, 高木 健一, 杉本 幸子, 高木 博史	アルコール発酵制御に関わる新規遺伝子の探索から明らかになった酵母 VTC 複合体の役割	
学会等名	発表年月日	発表場所
日本農芸化学会2017年度大会	2017年03月17日 ~ 2017年03月20日	京都女子大学 (京都市)

発表者名	発表標題	
伊藤 稔, 渡辺 大輔, 杉本 幸子, 大橋 正孝, 山田 翼, 高橋 俊成, 高木 博史	生もと乳酸菌の共存が誘導する清酒酵母の炭素代謝変化及び清酒醸造への効果	
学会等名	発表年月日	発表場所
日本農芸化学会2017年度大会	2017年03月17日 ~ 2017年03月20日	京都女子大学 (京都市)

〔図書〕 計(0)件

著者名	出版社		
書名	発行年	総ページ数	

(課題番号: 16K18676)

(注)・印刷に当たっては、A4判(縦長)・両面印刷すること。

(6/7)

14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

〔出願〕 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

〔取得〕 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別
				出願年月日	

15. 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

国際研究集会名	開催年月日	開催場所

16. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

(1) 国際共同研究：-

17. 備考

奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 ストレス微生物科学研究室(高木研究室)
<http://bsw3.naist.jp/takagi/?cate=98>