

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29年度）

所属研究機関名称		奈良先端科学技術大学院大学	機関番号	14603
研究代表者	部局	バイオサイエンス研究科		
	職	助教		
	氏名	渡辺 大輔		

1. 研究種目名 若手研究(B) 2. 課題番号 16K18676

3. 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

4. 補助事業期間 平成28年度～平成30年度

## 5. 研究実績の概要

前年度までに、TORシグナルの下流因子のうち、発酵阻害の鍵を握るRim15pプロテインキナーゼに加え、アミノ酸の生合成・取込みに関連する遺伝子の発現誘導を司る転写因子Gcn4p/Gln3p/Gat1pも、発酵調節における「ブレーキ」として機能することを見出した。そこで本年度は、細胞内アミノ酸レベルとアルコール発酵の関係に着目して解析を行った。その結果、まず、TORC1の高活性化やGln3p/Gat1pの欠損により実際に発酵中のアミノ酸レベルが低下することが示された。一方、Rim15pの欠損は影響を及ぼさなかった。また、アンモニアからのアミノ酸の新規合成に重要なグルタミン酸デヒドロゲナーゼGdh1/2/3pの欠損は発酵力を上昇させ、細胞外からのアミノ酸の取込みを行うアミノ酸パーミアーズGap1の機能亢進は発酵力を低下させた。以上の結果から、TORシグナルは、Rim15pを介した経路とは独立に、細胞内アミノ酸プールを減少させることで発酵力を高めるといふ、新規な発酵調節メカニズムを明らかにすることができた。

また、Rim15pの下流経路についてさらに詳細な解析も実施した。Rim15pは、酵母からヒトに至るまで広く保存されたGreatwallファミリーに属し、下流に共通の細胞周期調節経路（-エンドスルフィン-B55 結合型プロテインフォスファターゼ2A）を有することが報告されている。遺伝子破壊株を用いた発酵試験の結果、これらが発酵力にも影響を及ぼすことを初めて明らかにした。さらに、現在までの研究で用いた出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*とは系統的に異なる分裂酵母*Schizosaccharomyces pombe*においても、同等の経路が発酵調節に関与していた。以上の結果から、真核生物に共通の解糖系/炭素代謝調節経路の解明につながる新規な知見が得られた。

## 6. キーワード

TORシグナル TORC1 アルコール発酵 Rim15p アミノ酸合成 アミノ酸取込み 酵母 解糖系

## 7. 現在までの進捗状況

区分 (1)当初の計画以上に進展している。

理由  
前年度の研究において細胞内アミノ酸プールが発酵調節に関与する可能性が示唆されたため、本年度は、アミノ酸合成・取込みの変異株を用いて、発酵速度および発酵中における細胞内アミノ酸レベルの測定を実施し、その仮説を証明するに至った。この知見は、アルコール発酵という炭素代謝経路が、細胞内アミノ酸の状態を反映して制御されることを表しており、炭素-窒素代謝クロストーク調節におけるTORシグナリングの意義の解明に近づくことができた。さらに、当初の研究計画からさらに踏み込んだ内容として、Rim15pの下流で働く、真核生物に共通の -エンドスルフィン-B55 結合型プロテインフォスファターゼ2A経路に着目し、発酵調節への関与を明らかにすることができた。以上をまとめると、TORC1の下流で、Rim15pを介した新規経路と、Rim15pを介さずに細胞内アミノ酸プールに作用する経路の両者が独立に発酵力に作用するという、発酵調節メカニズムの全体像が示されたことになる。これらの因子やシグナル伝達経路は真核生物において高度に保存されており、清酒酵母の研究を端緒として、他種の生物における代謝調節メカニズムの解明にも資する知見に辿り着いたことは特筆すべき進捗状況であると思われる。当初計画のうち、基礎研究に属する主要な項目についてはほぼ完了し、さらなる発展を目指している状況である。TORC1およびRim15pを介した発酵調節メカニズムに関する内容を中心に、原著論文の掲載や複数の学会発表を行うことができた。

2 版

## 8. 今後の研究の推進方策

今後は、当初計画の中でも応用研究のウェイトを高めつつ研究を遂行していく。清酒酵母の高発酵メカニズムの解明では、現在までに見出した発酵調節因子をコードする遺伝子上に、清酒酵母に特異的な変異が存在する可能性を想定し、その探索と、発酵力への影響の解析を継続して行う。計画時には、RIM15遺伝子上の機能欠損のみが清酒酵母の高発酵力を生み出す主要な要因であると考えていたが、本研究の進展によってさらに深いレベルの理解に到達し、醸造技術の基盤に貢献する知見が得られると期待される。また、清酒酵母以外の実用酵母菌株にも、本研究を通して明らかとなってきた有用な変異等を導入して、清酒醸造以外の発酵環境における発酵力への影響を調べる。特に、発酵調節を握る鍵因子（TORC1、Rim15p、プロテインフォスファターゼ2A、アミノ酸パーミアーゼなど）については、入手可能な阻害剤を用いて変異株のスクリーニング法に関する検討を行い、非遺伝子組換え技術を用いた人為的な発酵力改変を容易にする育種技術の開発を目指す。

## 9. 次年度使用が生じた理由と使用計画

次年度使用額が無いため、記入しない。

## 10. 研究発表（平成29年度の研究成果）

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Daisuke Watanabe, Hiroshi Sekiguchi, Yukiko Sugimoto, Atsushi Nagasawa, Naotaka Kida, and Hiroshi Takagi	4. 巻 in press
2. 論文標題 Importance of proteasome gene expression during model dough fermentation after freezing preservation of baker's yeast cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Akaraphol Watcharawipas, Daisuke Watanabe, and Hiroshi Takagi	4. 巻 17
2. 論文標題 Enhanced sodium acetate tolerance in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> by the Thr255Ala mutation of the ubiquitin ligase Rsp5	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 FEMS Yeast Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/femsyr/fox083	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 Shinsuke Ohnuki, Hiroki Okada, Anne Friedrich, Yoichiro Kanno, Tetsuya Goshima, Hirokazu Hasuda, Masaaki Inahashi, Naoto Okazaki, Hiroyasu Tamura, Ryo Nakamura, Dai Hirata, Hisashi Fukuda, Hitoshi Shimoi, Katsuhiko Kitamoto, Daisuke Watanabe, Joseph Schacherer, Takeshi Akao, Yoshikazu Ohya	4. 巻 7
2. 論文標題 Phenotypic diagnosis of lineage and differentiation during sake yeast breeding	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 G3 (Bethesda)	6. 最初と最後の頁 2807-2820
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1534/g3.117.044099	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 該当する

〔学会発表〕 計20件 (うち招待講演 9件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 渡辺大輔
2. 発表標題 清酒酵母をサイエンスしてみた
3. 学会等名 生物工学若手研究者の集い夏のセミナー (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 渡辺大輔, 伊藤稔, 杉本幸子, 大橋正孝, 山田翼, 高橋俊成, 高木博史
2. 発表標題 生もと乳酸菌の共存が誘導する清酒酵母の代謝改変および清酒醸造への効果
3. 学会等名 第3回関西醸造研究セミナー (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 渡辺大輔, 砂田啓輔, 高橋俊成, 山田翼, 高木博史
2. 発表標題 清酒醸造における新しい微生物間相互作用 -乳酸菌の「声」は酵母に届くか-
3. 学会等名 第69回日本生物工学会大会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2017年

2 版

1. 発表者名 渡辺大輔, 高木健一, 吉岡直哉, 杉本幸子, 高木博史
2. 発表標題 酵母アルコール発酵制御遺伝子のゲノムワイド探索から明らかになったリン酸-炭素代謝クロストーク調節
3. 学会等名 第69回日本生物工学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 梶原拓真, 渡辺大輔, 高木博史
2. 発表標題 パン酵母の高発酵力を生み出す遺伝的要因の探索
3. 学会等名 第69回日本生物工学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 渡辺大輔, 高木健一, 吉岡直哉, 杉本幸子, 高木博史
2. 発表標題 酵母アルコール発酵制御遺伝子のゲノムワイド探索から明らかになったリン酸-炭素代謝クロストーク調節
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第50回研究報告会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 梶原拓真, 渡辺大輔, 武田鋼二郎, 建部恒, 塩崎一裕, 高木博史
2. 発表標題 酵母Greatwallプロテインキナーゼを介したアルコール発酵調節経路
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第50回研究報告会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 渡辺大輔, 高木健一, 吉岡直哉, 杉本幸子, 高木博史
2. 発表標題 酵母アルコール発酵制御遺伝子のゲノムワイド探索から明らかになったリン酸-炭素代謝クロストーク調節
3. 学会等名 日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部2017年度合同大阪大会
4. 発表年 2017年
1. 発表者名 渡辺大輔
2. 発表標題 醸造微生物学のパラドックス～清酒酵母の高発酵能とストレス耐性～
3. 学会等名 第10回KITライフサイエンスセミナー（招待講演）
4. 発表年 2017年
1. 発表者名 渡辺大輔
2. 発表標題 清酒酵母の高発酵力に関する研究
3. 学会等名 平成29年度日本醸造学会大会技術賞受賞記念講演（招待講演）
4. 発表年 2017年
1. 発表者名 渡辺大輔, 杉本幸子, 梶原拓真, 高木博史
2. 発表標題 清酒酵母に見出したアルコール発酵調節因子Rim15pを介した栄養シグナル伝達経路の解析
3. 学会等名 平成29年度日本醸造学会大会
4. 発表年 2017年

2 版

1. 発表者名 熊野舞香, 渡辺大輔, 杉本幸子, 砂田啓輔, 高橋俊成, 山田翼, 高木博史
2. 発表標題 生もと乳酸菌の共存が誘導する清酒酵母の代謝改変および清酒醸造への効果
3. 学会等名 第9回日本醸造学会若手シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 渡辺大輔
2. 発表標題 出芽酵母ユビキチンリガーゼRsp5pを介した新規アルコール発酵調節機構の解明
3. 学会等名 酵母細胞研究会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 渡辺大輔
2. 発表標題 酵母ゲノムから解き明かす醸造特性のひみつ
3. 学会等名 日本生物工学会九州支部2017年度市民フォーラム (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 熊野舞香, 渡辺大輔, 杉本幸子, 砂田啓輔, 高橋俊成, 山田翼, 高木博史
2. 発表標題 生もと乳酸菌の共存が誘導する清酒酵母の代謝改変および清酒醸造への効果
3. 学会等名 日本農芸化学会関西支部例会 (第501回講演会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 渡辺大輔
2. 発表標題 清酒醸造における酵母と乳酸菌の相互作用
3. 学会等名 発酵と代謝研究会 平成29年度第2回勉強会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡辺大輔
2. 発表標題 『感じる』酵母～栄養環境とアルコール発酵の関係～
3. 学会等名 第26回HiHAセミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡辺大輔, 杉本幸子, 水野恵, 周延, 陳佳文, 赤尾健, 下飯仁, 前田達哉, 高木博史
2. 発表標題 酵母のアルコール発酵調節におけるTORC1シグナリングとアミノ酸の効果
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梶原拓真, 渡辺大輔, 武田鋼二郎, 建部恒, 塩崎一裕, 高木博史
2. 発表標題 酵母Greatwallプロテインキナーゼを介した新規アルコール発酵調節経路
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

2 版

1. 発表者名 松本拓也, 渡辺大輔, 志賀岳希, 北侑子, Tira Siti Nur Afiah, 高木博史
2. 発表標題 酵母ユビキチンリガーゼRsp5pを介したエタノールストレス応答およびエタノール発酵調節
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

1 1. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

計0件（うち出願0件 / うち取得0件）

1 2. 科研費を使用して開催した国際研究集会

計0件

1 3. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

-

1 4. 備考

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