

平成20年度 生物工学奨励賞（江田賞）受賞



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

北垣 浩志



Analysis of the Role of Yeast Mitochondria during Sake Brewing
and Its Application for Breeding of a Novel Yeast Strain

Hiroshi Kitagaki (*Fundamental Research Division, National Research Institute of Brewing, 3-7-1 Kagamiyama, Higashihiroshima, Hiroshima 739-0046, Present address: Faculty of Agriculture, Saga University, 1 Honjo-cho, Saga 840-8502*) *Seibutsu-kogaku* **87**: 66-71, 2009.

はじめに

清酒は、水と蒸した米およびそれから製造した麴を、酵母を増殖させた酒母に対して三段階に分けてタンクに投入し、そのままタンクの中のもろみを20～30日程度醸造させることで製造される日本古来の伝統酒である。この間、タンクの中は酵母自身が発生する二酸化炭素ガスで満たされ、また醸造期間中何回か蔵人が櫛棒でタンクの中のもろみをかき混ぜることはあるものの、それも空気を多量に巻き込むような形で行われることはない。そのため、醸造初期には米粒や麴の粒に含まれる酸素が物理的に溶解することで放出されることや櫛入れの操作、原料の投入などにより2-4 ppmの酸素が存在するが、これらの酸素が醸造初期にもろみから消費・放出された後は、酸素濃度は0-5 ppbというきわめて低い濃度に達する。また、麴菌が生産する米のデンプンを溶解および分解する糖質分解酵素が醸造中に働くおかげで、醸造の途中でもろみ中には最高10%近くのグルコース濃度となり、醸造終了までは常にグルコースが存在する。

醸造の初期ではある程度の酸素がステロールや不飽和脂肪酸の生合成に必要ではある²⁾ものの、初期以降では、清酒醸造中の酵母は、醸造途中で高泡に付着する少数の酵母を除けば、極端な低酸素、高糖濃度という環境に長期間曝されていると言える。

ミトコンドリアは酸素呼吸により多様な炭素源を
資化するための細胞内小器官である

ミトコンドリアは太古、好気性細菌でリケッチアに近縁の α プロテオ細菌が真核生物に取り込まれて細胞内共生したと考えられている細胞内小器官である。ミトコンドリアは二枚の脂質二重膜に囲まれており、細菌として太古、真核生物に取り込まれたときの膜トポロジーを現在も保持している。細胞内共生説を支持するように、ミトコンドリアには独自のDNAや脂質（カルジオリピン）が見いだされる。ミトコンドリアの一義的な役割は酸素呼吸によるエネルギー（ATP）の生産である。酸素呼吸とは解糖系やTCAサイクルで生産されたNADHやFADH₂、コハク酸の還元力を、ミトコンドリア内膜に局在する電子伝達系を通じて酸素に受け渡し、この過程で生じたミトコンドリア内膜を境にしたH⁺の勾配を使ってエネルギー物質であるATPを生産する過程である。酸素呼吸はacetyl-CoAからTCA cycleを経てエネルギーを取り出すことができるため、酸素呼吸を使えば生物はエタノールや酢酸、グリセロールなどさまざまな炭素源を資化して増殖することができる。

酵母は発酵時にはミトコンドリアの発達を抑制する

上記のミトコンドリアを使った酸素呼吸と対比されるのが、ミトコンドリアを経ないで細胞質で行われる発酵

である。発酵においては、酸素呼吸と違ってグルコースやフルクトースなど単純な炭素源しか資化することができない。こうした糖は細胞内に取り込まれたあと細胞質において解糖系で代謝され、途中で生産された還元力はミトコンドリアの電子伝達系を介さずに細胞質でアセトアルデヒドなどに受け渡される。還元力がアセトアルデヒドに受け渡された場合、エタノールが生産されるため、エタノール発酵と呼ばれる。清酒酵母を含めた *Saccharomyces cerevisiae* は通性嫌気性菌 *facultative anaerobes* に分類され³⁾、酸素呼吸と発酵の二つのエネルギー獲得方式を環境に応じて使い分ける生物である。酵母は、少なくとも制御された培養条件では、グルコースが0.5%以下で⁴⁾かつ酸素濃度が0.5 mM (16 ppb) 以上⁵⁾であればミトコンドリアを発達させ酸素呼吸を盛んに行うが、これらの条件の両方を満たさなければミトコンドリアの発達と酸素呼吸を抑制し発酵を行う。したがって、清酒醸造においては、初期以外のほとんどの期間、酵母は発酵を行う環境に曝されていると言える。

ミトコンドリア制御は自然界での 酵母の生き残りに有利である

上記のようなミトコンドリアの制御は、自然界において次のように酵母の生き残りに有利であることから、ゲノムに進化の歴史の中で固定されてきたと考えられる。グルコースが豊富で酸素がないときには酵母はミトコンドリアの発達を抑えて発酵をすることになり、その結果エタノールを生成し、他の微生物にダメージを与えてその間に増殖する（酵母はエタノールに他の微生物よりも強い）。グルコースを資化し尽くし、かつ酸素が存在すれば、ミトコンドリアを発達させて代謝系を酸素呼吸に転換し、エタノールを炭素源として資化して増殖する。いよいよすべての炭素源がなくなったら、胞子を形成して休眠状態に入り次の栄養源に出会うのを待つ。このように、グルコース濃度が高く酸素がないときにはミトコンドリアの発達を抑制し、グルコースがなくなり酸素呼吸が可能なきときにはミトコンドリアを発達させるような株は、糖の豊富な微小環境で他の微生物との競争に勝ち残る性質を持つことになる。結果として現在自然界で生き残っている酵母は、すべてそのような制御ができる株だけになっていると考えられる。

酸素呼吸の起こらない状態でのミトコンドリア

酵母が酸素呼吸時にミトコンドリアを発達させ発酵時にミトコンドリアの発達を抑制することは古くから電子顕微鏡を使って見いだされ、そのメカニズムは多くの微生物学者の興味を集めてきた。当初、微生物学者の興味

は、発酵から呼吸に変換するとき一気に発達するミトコンドリアは、他の膜から発生するのか、細胞の中の水溶性の部分から突如発生するのかというものであった。まず、無酸素条件においては酵母ミトコンドリアの構造は観察できないので、ミトコンドリアは突如発生すると主張する研究が報告された⁶⁾。しかしその後、染色方法を変えて無酸素条件の酵母からミトコンドリア様の構造を見だし、これを不完全な構造しか持たないもの“promitochondria”と解釈する研究が発表された⁷⁾ことから、ミトコンドリアは発酵から呼吸に変換するとき他の膜から発生するだろうという理解が共有されるようになった（ただし現時点においても、ミトコンドリアがどの膜から発生するのかという疑問は根本的には解決されていない⁸⁾）。この promitochondria には NADH-ferricyanide reductase の活性があるがミトコンドリアの Nde1p あるいは Nde2p, Ndi1p の活性ではなく混入した microsomal NADH-cytochrome b5 reductase の活性由来とする⁹⁾ 研究結果、電子伝達系阻害薬 KCN で部分的に阻害される酸素消費能があるがこの酸素消費能は電子伝達系阻害薬 antimycin A では阻害されないとする研究結果¹⁰⁾、酸素消費能はあるがステロールの合成活性由来とする研究結果¹⁰⁾、電子伝達系の成分である cytochrome *c* やユビキノンは含まれるが量は非常に少ないとする研究結果^{11,12)} など、解釈の難しい結果が多数報告されている。また研究手法にも、生化学的解析をするのにミトコンドリアを部分的にしか精製していない⁹⁾、ミトコンドリアの構造は数分で劇的に変わるのにその構造を染色により観察して結論を導いている¹³⁾、ミトコンドリアを明確に峻別する手法がない^{6,7)} などの問題があり、無酸素状態における酵母ミトコンドリアの存在や構造、機能に関して明確な認識は形成されていなかったと考えている。こうした基礎微生物学的研究だけでなく、産業微生物学的研究においても、リンゴ酒醸造において酵母のミトコンドリア電位ポテンシャルを rhodamine123 色素で調べた結果検出できず、ミトコンドリアの構造も共焦点レーザー顕微鏡で観察できなかったことから、リンゴ酒醸造中の酵母にはミトコンドリアは存在しないだろうと議論されている¹⁴⁾。1970年代初頭にも通気培養した酵母の発酵特性を検討する中で清酒醸造中の酵母の呼吸活性について議論されている¹⁵⁾ が、清酒醸造中の酵母ミトコンドリアの存在についての明確な結論は記述されていない。また近年になって、ミトコンドリアに局在する TCA サイクルの因子の遺伝子を破壊すると醸造される清酒の組成が変わることから清酒醸造の前半において TCA サイクルが有機酸の代謝を担っていることを明らかにした研究が発表されている¹⁶⁾。しかしながら、清酒醸造中に

酵母ミトコンドリアが存在しているのか、存在するとすればその構造はどのようなものかについての知見はない。よって、清酒はおろか産業的なアルコール醸造過程において、酵母ミトコンドリアの存在と構造に関する明確な知見はこれまでなかったと言える。

物質代謝・生物現象の場としてのミトコンドリア

微生物学的な観点からのミトコンドリア研究とは独立に、医学的な観点からのミトコンドリアの研究については1990年代から2000年代にかけて全世界で多くのresourceが投入された。こうした動きは、ヒトの病気の実に数十%がミトコンドリアに起因するという多くの研究結果から、ミトコンドリア研究が社会的に意義のある研究と認識されたことによると思われる。これらの研究によりミトコンドリアはたとえばアポトーシス（細胞の自殺）¹⁷⁾や活性酸素の発生¹⁸⁾、老化¹⁹⁾、ガン細胞において解糖系が昂進するWarburg効果^{20,21)}などの細胞全体の運命を制御する機能、また各種有機酸の合成・代謝²²⁾、リン脂質の一種であるphosphatidylserineの合成²³⁾、糖結合型スフィンゴ脂質の分解⁸⁾、アミノ酸であるスレオニンやセリン²⁴⁾、ロイシンやイソロイシン、バリン²⁵⁾、プロリン、アルギニン²⁶⁾やグルタミン酸^{27,28)}の合成・分解などの役割を持つことや、尿素サイクルの一部の酵素がミトコンドリアに局在すること²⁶⁾など各種物質の合成・分解・代謝の場となっていることが明らかにされてきた。現在の生物学者の中では、ミトコンドリアは酸素呼吸のためだけの細胞内小器官ではなく、広範な生物現象や物質代謝において中心的な役割を持つ細胞内小器官であるという認識が形成されていると考えている。

ミトコンドリアの形態は急速にかつダイナミックに変化する

ミトコンドリアは哺乳類での電子顕微鏡による観察結果などから、豆状の形態をしたものとして描かれることが多いが、実際にはつながった構造も取り、それらは相互にまるでありの巣のように相互に連結している(図1)²⁹⁾。また、ミトコンドリアは非常にダイナミックな構造体であり数分で断片化・融合や移動を実行する。ミトコンドリアは細胞内共生したバクテリアの名残である内膜と、それを包む宿主側の膜である外膜とで構成されているが、これらは脂質二重膜でできている非常に柔らかい構造物であり、外膜や内膜に局在する多くのタンパク質によってその構造を制御されている。これらの中にはミトコンドリアの断片化と融合を制御するタンパク質群があり、ミトコンドリアの形態はこれらのタンパク質の動態により実質的には決定されている³⁰⁾。ミトコンドリア断

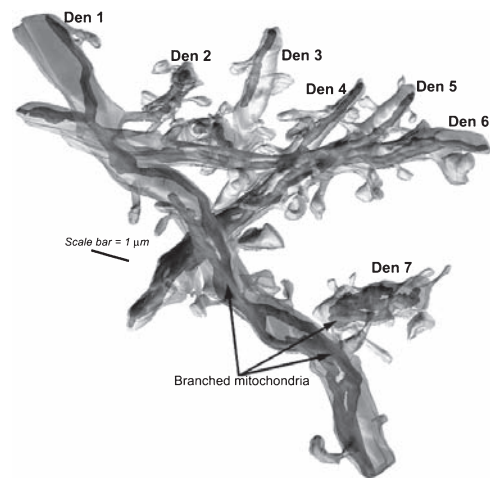


図1. ミトコンドリアの3次元構造²⁹⁾。ジリスのCA1放線状層の7つの隣り合うdendritic segmentsにおけるミトコンドリアの3次元構造を示す。それぞれの節は巨大な枝分かれしたミトコンドリアを含む。(文献29より許可を得て転載)

片化の因子を遺伝子破壊すると融合状態となり、ミトコンドリア融合の因子を遺伝子破壊すると断片化状態になるが、ミトコンドリア断片化と融合の両方の因子を破壊すると野生株と同じ形態になることから、ミトコンドリアの形態は断片化と融合の動的な平衡の上に成り立っていると考えられている。こうしたミトコンドリアの形態は外部の刺激によってダイナミックに変化し、哺乳類ではアポトーシスを起こす刺激に細胞が曝されると速やかに断片化しアポトーシスを制御していることが多くの報告¹⁷⁾で明らかにされている。

清酒醸造において酵母ミトコンドリアは途中で断片化し、最後まで存在する

清酒醸造は初期の期間以外、高糖濃度、低酸素というまさに発酵の状態で行われ、これはミトコンドリアの発達しない条件に合致する。しかし、独立行政法人酒類総合研究所において清酒醸造中の酵母のすべての遺伝子の発現プロファイルを解析した結果³¹⁾、清酒醸造の最後までミトコンドリアの遺伝子群は一定の発現を示していた。そこで、ミトコンドリアの物質代謝や生物現象における役割の重要性を鑑み、清酒醸造における酵母ミトコンドリアの存在と構造を調べることにした。ミトコンドリアは数分でその構造を変化させてしまうため、ミトコンドリアの膜ポテンシャルを利用した染色法や密度勾配を利用した精製法は適していないと思われたので、蛍光タンパク質GFPでミトコンドリアを可視化し、清酒醸造中ほぼreal timeにミトコンドリアを観察することにした。ミトコンドリアに移行するGFPを持った酵母で清酒を醸造してGFPの蛍光を観察すると、醸造初期には栄養増殖時と同じくフィラメント状の形態をしているが、醸

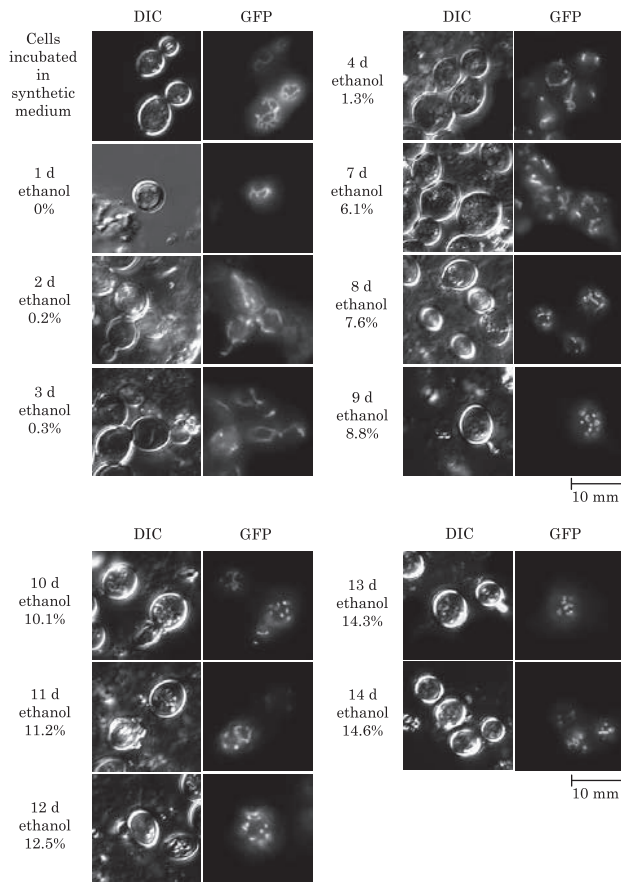


図2. 清酒醸造中に酵母ミトコンドリアは断片化する. ミトコンドリアへ移行するGFPを持った酵母で清酒を醸造し, 経時的にGFPを蛍光顕微鏡で観察した. 観察はサンプリングしてからすぐに直接スライドガラスに載せて行った.

造が進むに従って断片化していくことが明らかとなった(図2). また, その構造は醸造の最後まで観察することができた. この研究は, すべてのアルコール醸造で酵母ミトコンドリアの存在と構造を明らかにした初めての報告であった^{32,33}).

酵母ミトコンドリアの断片化は清酒醸造中の有機酸の代謝を制御する

次に清酒醸造で観察されたミトコンドリアの断片化のメカニズムを明らかにするための解析を行った. ミトコンドリアの外膜に局在する膜貫通型タンパク質であるFis1pは, ミトコンドリアの断片化を実行するMdv1pおよびCaf4p, Dnm1pを細胞質からミトコンドリア表層へリクルートする役割を持つ. *FIS1*を遺伝子破壊した酵母では清酒醸造中に酵母ミトコンドリアが断片化しなかった(図3)ことから, Fis1pが清酒醸造中の酵母ミトコンドリアの断片化に必須であることが明らかとなった.

次にこのFis1pを介した清酒醸造における酵母ミトコンドリアの断片化が清酒醸造中の物質代謝にどのような

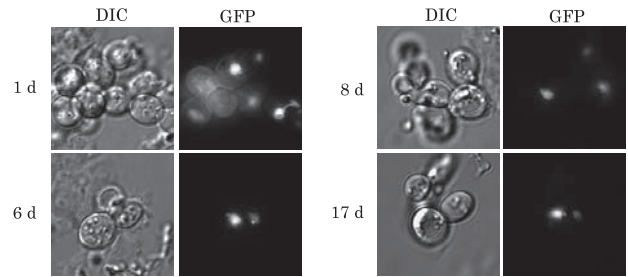


図3. 清酒酵母の*fis1*遺伝子破壊株はネットワーク状のミトコンドリアを醸造の最後まで維持する. 清酒酵母*fis1*破壊株にミトコンドリアへ移行するGFPを保持させ, 清酒を醸造して経時的にGFPを蛍光顕微鏡で観察した.

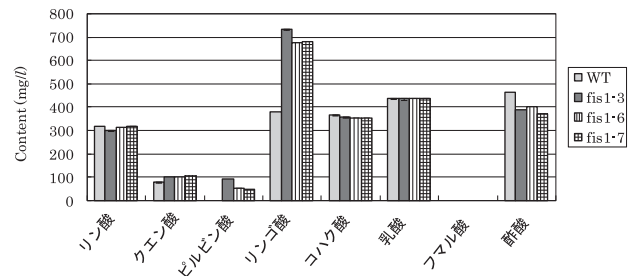


図4. 清酒酵母*fis1*遺伝子破壊株で醸造した清酒は多くのリンゴ酸を含む. 清酒酵母と清酒酵母*fis1*遺伝子破壊株で清酒を醸造し, 有機酸組成をHPLCで測定した. 値はひとつの株について3回のHPLC測定の平均値±SEMである.

影響を及ぼすかを調べるため, *FIS1*遺伝子を破壊した清酒酵母を用いて清酒を醸造し, その有機酸組成を測定した. その結果, 生成した清酒の有機酸組成は親株と比べて全般に変化しており, 特にさわやかな酸味を持つリンゴ酸の含量が約2倍に増加していることがわかった(図4)³⁴⁻³⁶. この結果は, 清酒醸造において酵母ミトコンドリアの形態が清酒醸造中の有機酸の代謝に影響を与えることを初めて明らかにすると同時に, ミトコンドリアの形態が変化した株さえ選抜すればリンゴ酸を高生産する酵母を育種できることも示している³⁷.

酵母ミトコンドリアの断片化は清酒醸造中の酵母の死滅を制御する

上記の*fis1*遺伝子破壊株を清酒醸造中に観察した結果, *fis1*遺伝子破壊株は野生株と比べて醸造末期で早く死滅していくことが明らかとなった. この結果から, 清酒醸造中の酵母ミトコンドリアの断片化は清酒醸造中の酵母の死滅を制御していると考えられた. そこで, *fis1*破壊株の清酒醸造における生存率の低さの原因を解析することとした. それまでに, 過酸化水素や酢酸による死滅において, Fis1pを介したミトコンドリアの断片化が酵母のアポトーシスを制御していることが報告されており³⁸, これらの刺激に対して*fis1*遺伝子破壊株は高感受性であ

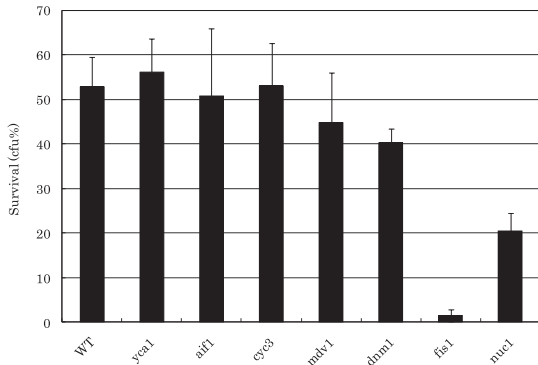


図5. *fis1* 遺伝子破壊株はエタノールに感受性である。BY4743の親株とアポトーシスに関連する各種の遺伝子破壊株を21%エタノールで処理し、3時間後に colony forming unit を測定した。生菌率はエタノール処理前の細胞数と比較することで算出した。値は3回の独立した実験の平均値±SEMである。

ることが知られていた³⁸⁾。清酒醸造における *fis1* 破壊株の死滅も、これらの結果と文献情報から考えると、少なくとも一部はアポトーシスの特徴を持つのではないかという仮説を立て、解析を行った。清酒もろみは固液共存系であり、定量的解析を行うのが難しかったため、表現型を明瞭にするために酵母を YPD 液体培地で通気培養した後、エタノールで処理を行った。通気培養した *fis1* 破壊株を親株とともにエタノールで処理して生存率を colony forming unit で測定したところ、確かに明瞭にエタノールに対して感受性であることが確認できた (図5)。さらにこの条件においてエタノールで処理した酵母のアポトーシスの表現型を調べたところ、ミトコンドリアの断片化、タンパク質の新規合成阻害剤による細胞死の抑制、核の凝縮・分断化、染色体やDNAの分解、活性酸素の発生など、一部の細胞は各種アポトーシスの表現型を示し、さらに *fis1* 破壊株においてはこれらの表現型が亢進しているとともにアポトーシスの中心的因子であるカスパーゼの阻害剤によりエタノール誘導死の一部が抑制された。これらの結果から、通気培養条件においてはエタノール誘導死の一部はミトコンドリア断片化経路 Fis1p を介したアポトーシスの側面を持つと考えられた (図6)³⁹⁾。アポトーシスにおいては活性酸素が重要な役割を持つことから、酸素のほとんどない清酒醸造において起きる酵母の死滅のうちどれくらいがアポトーシスの特徴を示すのかは解析方法の難しさもありまだ結論が得られていないが、育種株の現場への応用を考えると、アポトーシス関連の因子を操作することで *fis1* 遺伝子破壊株のエタノール感受性を改善することが考えられる。

以上、清酒醸造において酵母ミトコンドリアは最後まで存在し、途中で断片化するという観察結果から、ミトコンドリアのこの現象に付随する物質代謝・生物現象に

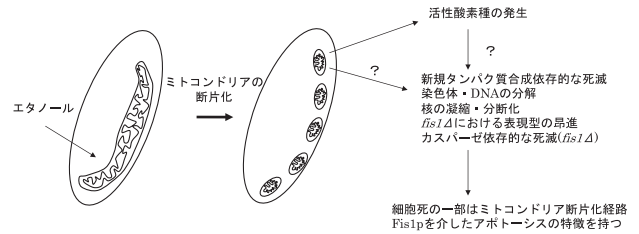


図6. Fis1pを介したミトコンドリア断片化経路はエタノール誘導アポトーシスを制御する。エタノールで酵母を処理したところ、ミトコンドリアが断片化し、一部の細胞で活性酸素の増加、新規タンパク質合成阻害剤による細胞死の抑制、染色体・DNAの分解、核の凝縮・分断化など各種アポトーシスの表現型が観察され、これらの特徴は *fis1* 破壊株で昂進しておりカスパーゼ活性依存的な細胞死が観察されたことから、Fis1p を介したミトコンドリア断片化経路はエタノール誘導アポトーシスを制御すると考えられた。

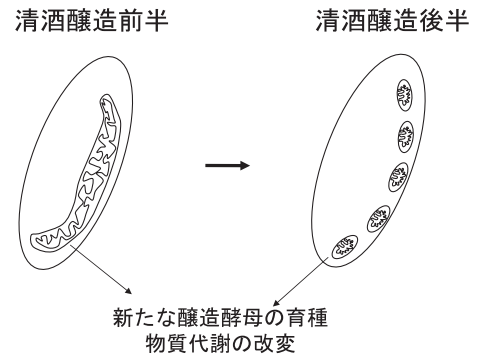


図7. ミトコンドリア研究を清酒へ、基礎研究で蓄積されたミトコンドリア生物学の知見を清酒醸造に応用することで、今後新たな醸造酵母の育種や物質代謝の改変が可能になると期待される。

ついて解析し、酵母ミトコンドリアの形態をターゲットとした有用清酒酵母の育種が可能であることを示した。今後、本研究結果を参考に、ミトコンドリアにおけるさまざまなイベントや物質代謝をターゲットとした清酒酵母の育種や、酵母ミトコンドリアにおける物質代謝を考慮した技術開発 (図7) に少しでも役立てていただければ望外の喜びである。

本研究は、以下に示す多くの先生方のご指導及び共同研究者の方々のご協力によって進めることができました。この場を借りて深く感謝申し上げます。ミトコンドリアの基本的な研究知識や手法については、米国サウスカロライナ医科大学のハヌン教授とオバイド教授、コワート研究准教授、ミトコンドリアの可視化については基礎生物学研究所の岡本浩二博士、米国ユタ大学のショー教授、有機酸の測定については独立行政法人酒類総合研究所の磯谷敦子主任研究員、アポトーシスの研究手法については広島大学大学院生物圏科学研究科の船戸耕一准教授、渡邊有氏並びに独立行政法人酒類総合研究所の荒木義雄博士及び周延博士、一倍体株の作製については広島大学大学院先端

物質科学研究科博士課程の加藤拓氏、清酒酵母の栄養要求性株については山口大学大学院医学系研究科の赤田倫治教授、育種のターゲットの選定については独立行政法人酒類総合研究所の平松順一理事長および三上重明醸造技術基盤研究部門長にご指導いただき、深く感謝申し上げます。大阪国税局鑑定官室勤務時に清酒醸造指導の基本的なノウハウ及び現場に即した研究をご指導いただいた井本吉彦主任鑑定官（現国税庁鑑定企画官）、川瀬直樹主任鑑定官（現福岡国税局鑑定官室長）、筒井謙之主任鑑定官（現広島国税局鑑定官室長）、神谷昌宏主任鑑定官（現名古屋国税局鑑定官室長）、岩槻安浩鑑定官（現金沢国税局鑑定官室長）、津川光昭元大阪国税局鑑定官室長、土井清太郎元大阪国税局鑑定官室長、清酒業界の杜氏、蔵人、技術者、研究者、経営者の皆様に感謝申し上げます。また酵母研究の基本的な考え方や研究の基本をお教えいただいた東京大学大学院農学生命科学研究科の山崎真狩教授（現・日本大学大学院生物資源科学研究科教授）、依田幸司教授、有岡学准教授、門倉広博士（現奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科グローバルCOE国際リサーチフェロー）、生化学的研究の進め方をご指導いただいた東京大学大学院総合文化研究科石浦章一教授、東京大学分子細胞生物学研究所の富岡茂雄博士、独立行政法人酒類総合研究所において研究全般にご指導いただいた遺伝子工学研究室室長（現鹿児島大学大学院農学研究科教授）の伊藤清博士にこの場をお借りして感謝申し上げます。紙幅のためすべて記載することはできませんが、東京大学、国税庁、鑑定官室、酒類総合研究所、サウスカロライナ医科大学と一緒に仕事をしたすべての皆様に何らかの形でお世話になりました。深く御礼申し上げます。

最後に、醸造酵母の基本的な知識、分子生物学的な酵母の研究を進めるための知識及び研究手法、研究全般に対する考え方を長年メンターとして丁寧にご指導いただいた、独立行政法人酒類総合研究所醸造技術基盤研究部門特別研究プロジェクトチームリーダーの下飯仁博士に心から御礼申し上げます。

なお、ここに記載した研究のほとんどは独立行政法人酒類総合研究所において行ったものであることを申し添えます。

本研究の一部は野田産業科学研究所の助成により行われたものであり、この場をお借りして感謝申し上げます。

文 献

- 1) 永井英雄, 近藤恭一, 三島秀夫, 竹村成三: 醸酵工学, **70**, 361-369 (1992).
- 2) Fornairon-Bonnefond, C., Demaretz, V., Rosenfeld, E., and Salmon, J. M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **93**, 176-182 (2002).
- 3) Stanier, R. Y., Adelberg, E. A., Ingraham, J. L., and Wheelis, M. L.: 微生物学, p.24, 培風館 (1979).
- 4) Brauer, M. J., Saldanha, A. J., Dolinski, K., and Botstein, D.: *Mol. Biol. Cell*, **16**, 2503-2517 (2005).
- 5) Burke, P. V., Kwast, K. E., Everts, F., and Poyton, R. E.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 1040-1044 (1998).
- 6) Wallace, P. G. and Linnane, A. W.: *Nature*, **201**, 1191-1194 (1964).
- 7) Criddle, R. S. and Schatz, G.: *Biochemistry*, **8**, 322-334 (1969).
- 8) Kitagaki, H., Cowart, L. A., Matmati, N., Vaena de Avalos, S., Novgorodov, S. A., Zeidan, Y. H., Bielawski, J., Obeid, L. M., and Hannun, Y. A.: *Biochimica Biophysica Acta Biomembranes*, **1768**, 2849-2861 (2007).
- 9) Rosenfeld, E., Schaeffer, J., Beauvoit, B., and Salmon, J. M.: *Antonie Van Leeuwenhoek*, **85**, 9-21 (2004).
- 10) Rosenfeld, E., Beauvoit, B., Rigoulet, M., and Salmon, J. M.: *Yeast*, **19**, 1299-1321 (2002).
- 11) Lowdon, M. J., Gordon, P. A., and Stewart, P. R.: *Arch Mikrobiol.*, **85**, 355-361 (1972).
- 12) Rogers, P. J. and Stewart, P. R.: *J. Bacteriol.*, **115**, 88-97 (1973).
- 13) Visser, W., van Spronsen, E. A., Nanninga, N., Pronk, J. T., Gijs Kuenen, J., and van Dijken, J. P.: *Antonie Van Leeuwenhoek*, **67**, 243-253 (1995).
- 14) Lloyd, D., Moran, C. A., Suller, M. T. E., and Dinsdale, M. G.: *J. Inst. Brew.*, **102**, 251-259 (1996).
- 15) 山城敬一, 谷 喜雄, 福井三郎: 発酵型酵母の好気培養とその応用, 清酒酵母の研究, p.107-133 (1972).
- 16) 浅野忠男: 生物工程, **85**, 63-68 (2004).
- 17) Suen, D. F., Norris, K. L., and Youle, R. J.: *Genes Dev.*, **22**, 1577-1590 (2008).
- 18) Chen, Y. and Gibson, S. B.: *Autophagy*, **4**, 246-248 (2008).
- 19) Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J. N., Rovio, A. T., Bruder, C. E., Bohlooly-Y, M., Gidlöf, S., Oldfors, A., Wibom, R., Törnell, J., Jacobs, H. T., and Larsson, N. G.: *Nature*, **429**, 417-423 (2004).
- 20) Warburg, O., Wind, F., and Negelein, E.: *Klin. Woch.*, **5**, 829-832 (1926).
- 21) Gogvadze, V., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B.: *Trends Cell Biol.*, **18**, 165-173 (2008).
- 22) Ishii, N., Ishii, T., and Hartman, P. S.: *Mitochondrion*, **7**, 24-28 (2007).
- 23) Voelker, D. R.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **1486**, 97-107 (2000).
- 24) Ramos, F. and Wiame, J. M.: *Eur. J. Biochem.*, **123**, 571-576 (1982).
- 25) Kohlhaw, G. B.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **67**, 1-15 (2003).
- 26) Wu, G. and Morris, S. M. Jr.: *Biochem. J.*, **336**, 1-17 (1998).
- 27) Bowsler, C. G. and Tobin, A. K.: *J. Exp. Bot.*, **52**, 513-527 (2001).
- 28) Arco, A. D. and Satrustegui, J.: *Cell Mol. Life Sci.*, **62**, 2204-2227 (2005).
- 29) Popov, V., Medvedev, N. I., Davies, H. A., and Stewart, M. G.: *J. Comp. Neurol.*, **492**, 50-65 (2005).
- 30) Wu, H., Zheng, X., Araki, Y., Sahara, H., Takagi, H., and Shimoi, H.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 7353-7358 (2006).
- 31) Kitagaki, H. and Shimoi, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **104**, 227-230 (2007).
- 32) 北垣浩志, 下飯 仁: 化学と生物, **46**, 86-87 (2008).
- 33) Kitagaki, H., Kato, T., Isogai, A., Mikami, S., and Shimoi, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **105**, 675-678 (2008).
- 34) 北垣浩志, 下飯 仁: 醸協, **103**, 314-320 (2008).
- 35) 北垣浩志: 生物工程, **86**, 238 (2008).
- 36) 北垣浩志, 三上重明, 下飯 仁: 特願2007-320389 (2007).
- 37) Fannjiang, Y., Cheng, W. C., Lee, S. J., Qi, B., Pevsner, J., McCaffery, J. M., Hill, R. B., Basañez, G., and Hardwick, J. M.: *Genes Dev.*, **18**, 2785-2797 (2004).
- 38) Kitagaki, H., Araki, Y., Funato, K., and Shimoi, H.: *FEBS Lett.*, **581**, 2935-2942 (2007).