

論文の内容の要旨

氏名：小林 洋介

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

論文題名：浸透圧耐性酵母 *Moniliella megachiliensis* におけるストレス応答とポリオール生産

エリスリトール (1, 2, 3, 4-butanetetrol) は炭素数 4 個からなる 4 炭糖の糖アルコールであり、微量ではあるが醤油、清酒、チーズなどの発酵食品、食用きのこ類および果実類に含まれており、古くからごく自然な形で日常的に食されてきた物質である。卓上甘味料や飲料、菓子類、錠剤など広く食用に利用されており、食品以外にも口腔洗浄剤、化粧品の保湿剤など様々な用途がある。さらに、近年、バイオプラスチックなど化成品の原料としての利用も注目されている。

ほとんどの糖アルコールが単糖や二糖、オリゴ糖のアルデヒドを化学的に還元してアルコールに変えて製造されている中で、エリスリトールは担子菌系酵母である *Moniliella megachiliensis* などを用いたグルコースからの発酵生産によって生産されている。*M. megachiliensis* を用いた発酵法によるエリスリトールの工業的生産は我が国で世界に先駆けて確立されたオリジナル技術である。*M. megachiliensis* は浸透圧ストレスに応答してエリスリトールを生成していると考えられており、このような細胞内に蓄積する低分子有機化合物を適合溶質 (compatible solute) と呼ぶ。しかし、適合溶質生成機構の詳細が明らかになっているのはごく限られたモデル生物のみであり、多くの産業上有用な生物では解明されていない。

M. megachiliensis におけるエリスリトールの生成経路は解糖系とペントースリン酸回路の共役によって生成されたエリスロース-4-リン酸が、次いで Erythrose-4-phosphate phosphatase の作用で無機リン酸が脱離してエリスロースとなり、さらに Erythrose reductase (ER) の作用によりエリスリトールが生成される。浸透圧などのストレスが負荷されると、これらの酵素遺伝子が反応してストレス耐性機構が活性化すると考えられている。これまで ER のタンパク質レベルでの解析は進められているが、遺伝子レベルでの機能解析は行われていない。また、*M. megachiliensis* は他菌株では生成が極稀なエリスリトールをグリセロールよりもはるかに多量に生成することから、モデル生物よりも複雑な糖代謝経路を有していることが予想される。

本研究では、エリスリトール生産菌である *M. megachiliensis* において ER 遺伝子を含む周辺塩基配列を取得するとともに、その発現動態や機能解析を行うこと、ストレス応答時における糖代謝機構を明らかにすることで、ストレス応答に伴うエリスリトール生成の機能解明、および発酵によるエリスリトール生産の最適化に向けた基礎的知見を提案することとした。

1 *M. megachiliensis* におけるエリスリトール生成関連酵素 Erythrose Reductase 遺伝子の構造と機能解析

M. megachiliensis の ER には 3 種類のアイソザイムが確認されており、それぞれ ER1、ER2、ER3 と名付けられている。エリスリトールが適合溶質として生成されることと 3 種類のアイソザイムを有していることから、いずれの遺伝子がストレスに反応して機能するか興味を持たれた。そこでまず、ER 遺伝子の 5' 上流域について塩基配列の決定を行った。この結果、全ての ER 遺伝子に STRE (stress response element: ストレス応答配列) が存在したが中でも ER3 遺伝子は開始メチオン-150 bp 以内に 2 つ存在し、ストレス応答に最も関与しているらしいことが示唆された。本結果を受け、本菌を 2% と 20% グルコース条件下で培養し、ER 遺伝子およびグリセロール生成関連遺伝子の GPD 遺伝子の発現量を測定したが、両条件下では ER 遺伝子の発現量は差が見られず、一方で GPD 遺伝子の発現量は 2% グルコース条件下と比べて約 60 倍も高発現していた。そこで、エリスリトール生成時期を特定し、その時期の発現量を解析することとした。その結果、エリスリトールは対数増殖期以降の培養後期に蓄積が始まり、ER 遺伝子の発現量もそれに呼応するように高発現していた。これらのことから、*M. megachiliensis* は浸透圧ストレスに対して、初期応答では適合溶質として主にグリセロールを生成し、静止期に至るにつれてエリスリトールを生成することを明らかにした。培地中のグルコースが枯渇した条件でもエリスリトール生成が行われていたことからグルコースの取り込みを経由しない代謝経路の存在が示唆された。この点に関しては第 2 章にて後述する。さらに ER の機能解析を行うために、

*Saccharomyces cerevisiae*を用いた ER 遺伝子の異種発現を行い、エリスリトール生成の比較をおこなったが有意差は見られず、*M. megachiliensis*と *S. cerevisiae*ではエリスロース-4-リン酸以降の代謝経路が異なっていることを明らかにした。

2 *M. megachiliensis*におけるストレス応答によるエリスリトールと貯蔵糖の代謝相関

第1章において、培地中のグルコースが残存していないにも関わらずエリスリトールの生成が確認されたことから、菌体内の他の炭素源の関与が推定された。また、エリスリトールとグリセロールは条件によって適合溶質を使い分けていることから、その条件を明らかにした。まず、菌体内の貯蔵糖について検出を行い、多量のトレハロースとグリコーゲンの存在を確認した。この2つの物質は20%グルコース条件下でも2%グルコース条件下と同等の蓄積経過を示したことから、ストレス応答には直接関与しない貯蔵糖であることを明らかとなった。次に、トレハロースが蓄積した菌体を40%グルコース（浸透圧ストレス）および0.1 mM メナジオン（酸化ストレス）で処理し、菌体内の貯蔵糖及びポリオールの変化について検討した。その結果、両条件においてトレハロースは減少した。一方、他のポリオール生成に関しては40%グルコース条件下においてグリセロールの生成量が顕著に増加し、一方、0.1 mM メナジオン条件下ではエリスリトールの生成量が顕著に増加していた。これらの結果より、トレハロースはストレス負荷に対応するための貯蔵物質として利用されることが考えられた。また、貯蔵糖の分解によって得られた代謝産物は、高浸透圧条件下では適合溶質としてまずグリセロールに変換され、時間経過とともにエリスリトールに移行すること、酸化ストレスでは初期段階からエリスリトールに変換されることが明らかとなった。この時のトレハロース代謝関連遺伝子の発現量に関しては、TRE 遺伝子や TPS 遺伝子など一部遺伝子において相関性が見られた。しかし、相関がみられない遺伝子も多く、また、この代謝経路に関しては複雑な制御システムが報告されていることから、cAMP やアロステリックエフェクターなど様々な物質の関与が考えられた。

3 新たな用途に向けた *M. megachiliensis*によるエリスリトールの発酵生産

第2章、第3章に関しては菌体の糖代謝制御についての報告であり、エリスリトール生産の効率化に向けた研究である。本章では未用資源からのエリスリトール生産について検討することとした。グルコース以外の炭素源についての検討結果から生育が確認された炭素源のうち、バイオディーゼル燃料の廃棄物として多量に生産される廃グリセロールに注目し、これを炭素源として検討を行った。廃グリセロールはパーム油由来および牛脂由来の精製されたもの、および未精製のものを用いた。これら炭素源で培養した菌体はグルコースを炭素源とした時と同様にエリスリトールを生成していたことから、基質としてグリセロールの精製度はエリスリトール生成に大きく影響しないことを明らかになった。また、菌体内にトレハロースの生成が確認されたことから、グルコース-6-リン酸までは糖新生されていることが推定された。次に、グリセロール濃度について検討した結果、20%条件までは良好な生育を示し、生育速度が遅くなるものの最大で30%まで生育可能であった。20%パーム油由来未精製グリセロールを炭素源に用いた時のエリスリトール変換効率は最大で約60%を示した。これら結果より、予備的ではあるが安価な廃棄資源である未精製のグリセロールからバイオ樹脂などの化学用途を目指したエリスリトールの発酵生産技術の可能性が示唆された。

総括

*M. megachiliensis*のエリスリトール生成にはER 遺伝子、特にER3 遺伝子が大きく関与していることを証明した。また、*M. megachiliensis*は適合溶質としてグリセロールとエリスリトールを生成し、貯蔵糖としてトレハロースとグリコーゲンを生成することを明らかにした。そして、浸透圧ストレスに対して、トレハロースを分解して、初期応答ではグリセロール、培養後期に至るにつれてエリスリトールを適合溶質として生成することで生存を図っていると考えられた。酸化ストレスに対しても浸透圧ストレスと同様にトレハロースを分解してエネルギーを得るが、グリセロールの生成は微量でありエリスリトールを大量に生成することによって適応を図っていることが示唆された。また、代謝工学的な知見のみならず、安価な廃棄資源である未精製のグリセロールからバイオ樹脂などの化学用途を目指したエリスリトールの発酵生産技術の可能性を示した。

今後、エリスリトールの高生産のためには、更なる代謝経路の解明と遺伝子導入系の確立、廃グリセロールを用いた時の培養条件の検討などが必要である。