

論文の内容の要旨

氏名：岩田 悠志

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

論文題名：*Moniliella megachiliensis*におけるエリスリトール生成と環境ストレス応答機構

序論

エリスリトールは、4炭糖の糖アルコールで、ショ糖の約75%の爽快な甘味をもち、果実類、発酵食品、キノコ類などに含まれている。また、栄養表示基準によるエネルギー値はゼロであり、非う蝕性や抗酸化性などの優れた機能を有している。現在、糖アルコールの中で唯一発酵法により工業生産されており、食品、化粧品、医薬品などに利用されている。近年では、エリスリトールからバイオプラスチックへの触媒変換技術の開発とともに、化学製品への利用が期待されており、さらなる生産性の向上が望まれている。

*Moniliella megachiliensis*は、乾燥果実から分離された菌であり、60%グルコース溶液（3.3 M）のような高浸透圧条件下でも生育する極めて浸透圧耐性の高い担子菌系酵母である。浸透圧下で生成する適合溶質は出芽酵母のようなグリセロールではなく、エリスリトールを蓄積することで細胞内外の浸透圧差を解消している。エリスリトールは、一部の乳酸菌を除いてペントースリン酸経路（PPP）の中間代謝産物であるエリスロース-4-リン酸（E4P）を経て、エリスロースレダクターゼ（ER）によって生成することが明らかになっている。現在まで微生物の浸透圧ストレス応答と適合溶質の生成に関する研究は、*Saccharomyces cerevisiae* またはその類縁の酵母で行われており、いずれも解糖系からのグリセロール生成に関するものに限られていた。これまでに *M. megachiliensis* のエリスリトール生成への関与が示唆される酵素群の中で、エリスロースレダクターゼについては、3種のアイソザイム（ER1, ER2, ER3）の存在と、その機能を明らかにしている。その中で ER3 の5'上流域に *S. cerevisiae* のグリセロール生成の鍵酵素である *GPD1*（*ScGPD1*; Glycerol-3-phosphate dehydrogenase1）と同様のストレス応答に関与する STRE（stress response element）配列が存在し、この isozyyme がエリスリトール生成に深く関わっていることを報告した。さらに、浸透圧ストレスシグナル伝達を担う MAPK Hog1 がエリスリトール生成系の上流に存在し、浸透圧に反応して発現が上昇することを確認した。このことからエリスリトールは、*S. cerevisiae* におけるグリセロールと同様、細胞内の浸透圧調節を行うための適合溶質であると考えられる。しかしながら、*M. megachiliensis* のようにエリスリトールを適合溶質とする真核微生物についての浸透圧ストレスと糖代謝に関する報告は、ほとんど見当たらない。そこで、PPP における主要な酵素で、エリスリトールの前駆体となるエリスロース-4-リン酸を生成するための鍵酵素 transketolase（TKL）と transaldolase（TAL）に注目した。本研究では、エリスリトール生産性の向上を目途に、浸透圧ストレスを初めとする様々な環境ストレスに対する適応機構解明の一環として、TKL および TAL 遺伝子の取得と発現動態の解析、さらに、本菌の適合溶質生成と環境適応との関連性について考察した。

1. 環境ストレスにおける Transketolase, Transaldolase 遺伝子とポリオール生成

TKL と TAL には、2個ずつの isogene（TKL; *MmTKL1*, *MmTKL2*, TAL; *MmTAL1*, *MmTAL2*）が存在し、それぞれの isogene には、配列の相違が見られたが、本質的な機能領域は保存されていた。また、浸透圧応答に関与する転写因子の結合領域である STRE 配列は *MmTKL1* と *MmTAL2* とに存在した。一方、酸化ストレス応答に関与する転写因子の結合領域である AP-1 配列（ap-1 response element）は *MmTKL2*

と *MmTAL1* とに存在した。そこで、浸透圧ストレス (1.2 M NaCl) 及び酸化ストレス (0.15 mM Menadione) 条件下で培養初期段階 (2 hr まで) の mRNA の発現動態を半定量的 PCR により解析をしたところ、ストレスの種類により、浸透圧や酸化ストレスに対して応答する遺伝子の発現量に差 (2 倍以上) があることが判明した。また、ポリオール生成については、浸透圧及び酸化ストレスともにエリスリトールの蓄積量が増加した。このように、各種ストレス応答の初期段階において、ストレスの種類により、遺伝子の発現量に差があり、浸透圧ストレス (1.2 M NaCl) では、*MmTKL1* と *MmTAL2* が応答、酸化ストレス (0.15 mM menadione) では、*MmTKL2* と *MmTAL1* が応答したことから、これらの酵素遺伝子はエリスリトール生成系をストレスに応じて代謝調節していることが示唆された。

2. 浸透圧ストレス条件下における適合溶質生成とその関連遺伝子のプロファイル

浸透圧ストレス応答と適合溶質生成についての研究の中で、Sorbitol を浸透圧剤として用いたとき、グリセロールやエリスリトールの生成量は、ストレス負荷前と変わらないことが判明した。このことから、Sorbitol が浸透圧剤として感知されていないのではないかと考えられた。そこで、浸透圧剤として Sorbitol、NaCl、Glucose を用いた本菌の浸透圧応答と適合溶質生成について、*S. cerevisiae* を対照に検討した。*M. megachiliensis* と *S. cerevisiae* S288c を YPD 培地 (1% Yeast Extract, 2% Peptone, 2% Glucose) にて、それぞれを対数増殖期まで培養した。次に、NaCl、Glucose、Sorbitol を添加して、60 分間の浸透圧を負荷した。それら菌体からのポリオールを HPLC、遺伝子の発現量を半定量的 RT-PCR により解析した。その結果、対照と比較して NaCl 条件下では、Erythritol と Glycerol が上昇し、Glucose 条件下では、Erythritol のみが上昇した。また、Sorbitol 条件下では、若干の Erythritol を蓄積した。このとき、*S. cerevisiae* より細胞外の Sorbitol を約 2 倍量取り込んでいた。一方、*S. cerevisiae* は、いずれの浸透圧条件下でも Glycerol を蓄積した。また、各種の浸透圧負荷に関わらず、常に高いレベルのトレハロースを蓄積していた。本菌には 3 個の *GPD* (*MmGPD1*, *MmGPD2*, *MmGPD3*) と 3 個の *ER* (*ER1*, *ER2*, *ER3*) 遺伝子が存在することを明らかにしていることから、各浸透圧条件下において、これら isogene がどのように発現応答しているのか半定量的 RT-PCR により解析した。その結果、*MmGPD2* は、浸透圧応答する *ScGPD1* と同じ発現挙動を示し、グリセロール生成との相関性を示した。また、*MmGPD3* は、*MmGPD2* の発現動態とは異なるが、浸透圧により応答することが判明した。エリスリトール生成の鍵酵素である *ER3* も浸透圧ストレスにより発現応答し、エリスリトール生成との相関性を示した。また、*MmGPD1* 及び *MmER1*, 2 は浸透圧ストレスの負荷に関わらず定常発現していた。以上のことから、浸透圧ストレスの初期応答において *M. megachiliensis* は、浸透圧の種類により細胞内の代謝を調節し、それに伴って蓄積する適合溶質を選択的に使い分けていることが明らかとなった。

3. グリセロールからのエリスリトールの発酵生産とその代謝経路の解明

エリスリトールは低カロリー甘味料として様々な食品や化粧品に利用されているが、これらに加え、近年では高効率の還元技術により、バイオ樹脂等化学製品の原料としての利用が期待されている。化学製品原料としては、コスト低減が最重要課題となることから、我々はエリスリトール収率の向上を目途に、環境廃棄資源である廃グリセロール (牛脂由来やパーム油由来) を炭素源とするエリスリトール生産並びにグリセロールからエリスリトールに至る代謝制御の解明を行った。牛脂由来廃グリセリン (20%, w/v) からのエリスリトール生産収率は、約 5% とパーム油由来 (約 12%) に比較して低かった。この培地の pH は、10~11 と強アルカリ性であり、それを希硫酸により中和することで、生産量

および変換率ともに、高い値（野生株：約 20%，変異株：約 30%）を示した。この値は、パーム油由来廃グリセリンと同等であることから、牛脂由来廃グリセリンの利用は、エリスリトールの低コスト発酵生産の観点から有用であることが示された。炭素源としてパーム油由来廃グリセリンを用い、窒素源（Yeast Extract）と炭素源の最適濃度を検討し、その条件におけるグリセロールからのエリスリトールへの代謝系について解析した。その結果、両菌株ともに窒素源濃度 0.5%（w/v）と炭素源濃度 20%もしくは、30%（w/v）を用いた時に、エリスリトール生産量や変換率は、最も高い値（野生株：約 15%，変異株：約 40%）を示した。そこで、グリセロールの浸透圧ストレスが Glucose や NaCl など他の浸透圧剤と同様な影響を与えるのかを検討するために、PPP の鍵酵素である *Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH)* と *TKL* の mRNA の発現解析を行った。その結果、*MmTKL1* がグリセロール依存的に発現応答を示した。また、本菌の G6PDH には、前述のように 3 個の isogene が存在することを明らかにしているが、そのうち *MmG6PDH1* と *MmG6PDH3* がグリセロール濃度に関わらず定常的な発現を示し、*MmG6PDH2* は、検出不可なレベルであった。これらのことから、グリセロールからエリスリトールへの生物代謝変換では、TKL が強く関与していることが示唆された。

総括

M. megachiliensis の TKL, TAL には、それぞれに 2 種の isogene が存在し、配列の違いはあるものの、機能領域には高い保存性が見られた。ストレスの種類（浸透圧、酸化）により、これらの isogene を使い分けながら、エリスリトール生成を調節していることが判明した。浸透圧ストレスにおいては、浸透圧剤の種類（Sorbitol, NaCl, Glucose）により細胞内の代謝に関わる遺伝子を制御し、適合溶質を選択的に生成することで、それら環境下に適応していると考えられた。化学用途に向けたエリスリトールの低コスト発酵生産において、当初不適と思われた牛脂由来廃グリセリンは、pH 調整するのみで、エリスリトール発酵生産への利用が可能であることが示された。さらに、グリセロールによる浸透圧ストレス下で、グルコースによる浸透圧ストレスとは異なる代謝制御が行われていることが示唆された。

今後、エリスリトール生成は浸透圧ストレスのみならず、酸化的要因も深く関わることから、レドックス制御との関連性についても、解析を進める。また、グリセロールからのエリスリトールへの代謝は、糖新生の関与が推定されるために新たな代謝経路であるとともに、発酵生産的な観点からも興味を持たれるところであり、検討の予定である。