



生 物 コ ー ナ

Moniliella 属酵母と浸透圧ストレス応答 ポリオール生成と糖代謝に見る適応戦略

はじめに

通常の微生物は、醤油・味噌など塩分濃度の高い食品や樹液・落下果実のように糖濃度の高い物質など、いわゆる水分活性の低い環境下では生存が難しい。これを利用して、食塩やショ糖を食品に添加（塩蔵、糖蔵）し、腐敗を防ぐことが行われてきた。一方で、このような環境下で生育可能な微生物も少なくない。Moniliella属はジャム、マーマレード、ハチミツなどの食品や昆虫の幼生体表に見いだされた担子菌系の酵母（不完全菌）で、糖濃度の高い環境を好んで生育する。なかでも、Moniliella megachiliensis SN-124A⁽¹⁾は、筆者らが乾燥果実から発

見した極めて高い浸透圧耐性をもつ酵母で、60%グルコース（3.3 M溶液）中でも増殖が可能である。高浸透圧下で著量のエリスリトールを生成することから、エリスリトールの工業的生産菌として用いられてきた。以前はTrichosporonoides属と称されたが、2009年にMoniliella属への統合が提唱され⁽²⁾、その2年後にTrichosporonoides属が廃止された（The Yeast 5th ed., 2011）。なお、種名のmegachilieとは、アルファルファハキリバチ（Megachilie rotunda）の学名で、最初にこのハチの幼生体表から発見されたことに因む。工業的利用面で知られる反面、本菌に関する基礎的知見は極めて少ない。そこで、これまでに得られた結果を基に、高浸透圧環境下にお

ける本菌の適応戦略についてポリオール生成と糖代謝の観点から概説してみたい。

Saccharomyces cerevisiaeとグリセロール

真核生物の浸透圧調節に関しては、出芽酵母（S. cerevisiae）によるグリセロールの生成が最もよく研究されている。出芽酵母は高浸透圧下でグリセロールを多量に生成し、一時的に細胞内の浸透圧を高めて細胞内からの水や無機イオンの漏出を抑える。次いで、グリセロールを適当量生成または排出して細胞内外の浸透圧を調節しながら、高浸透圧環境への適応を図る（図1）。

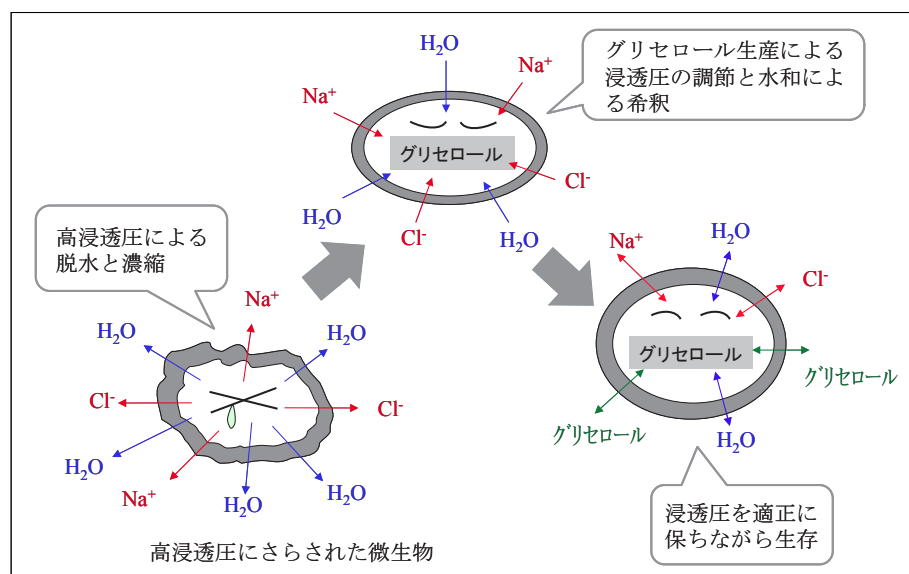


図1 ■ 出芽酵母の浸透圧調節と生体防御



表1 ■ 浸透圧調節のために生成される主な適合溶質

生物	適合溶質
細菌	グリシンベタイン, プロリン, グルタミン酸 エクトイン, トレハロース
古細菌, 好塩菌 らん藻	KCl, グリシンベタイン, エクトイン, プロリン スクロース, トレハロース グルコシルグリセロール, グリシンベタイン
海藻	マンニトール, グルコシルグリセロール, プロリン
酵母	グリセロール, マンニトール
糸状菌	グリセロール, マンニトール, アラビトール
植物	スクロースなど糖類, アミノ酸

このように、浸透圧の調節が目的で細胞内に蓄積される溶質は適合溶質 (compatible solute) と呼ばれ、細胞機能や細胞内の生化学的な反応過程に悪影響を与えない物質である。これまでに知られている主な適合溶質とそれを生成する生物の例を表1に示した。水溶性の糖または糖アルコール、アミノ酸またはその類縁体がほとんどを占めている (表1)。

高浸透圧環境への適応は細胞のストレス応答の一つであり、浸透圧ストレスのシグナル伝達系 (HOG系路) と制御系 (グリセロール生成系) の2つの系からなる。浸透圧ストレスを感知し、適応する情報伝達経路は HOG 経路 (High Osmolarity Glycerol Pathway) と呼ばれ、細胞の増殖、分化、修復などに関連する MAP キナーゼ (MAPK: mitogen-activated protein kinase) カスケードの一つである⁽³⁾。浸透圧ストレスが感受されると、細胞表面近辺に存在する浸透圧センサー (タンパク質) が、その情報を HOG 系

路の最下流に位置する Hog1 に伝達する。Hog1 は serine/threonine protein kinase で、MAPK カスケードを通じてリン酸化され活性化された Hog1 は細胞質から核内に移動し複数の転写因子と共同しながら、GPD (glycerol-3-phosphate dehydrogenase) および GPP (glycerol-3-phosphate phosphatase) 遺伝子の転写を促す。その後核内で脱リン酸化酵素 (PTP2, PTP3) によって脱リン酸化され、再び核外に戻る。HOG系路は浸透圧ストレスのほかにも酸化および熱ストレス、細胞周期など150以上の関連遺伝子の制御を行うとされている⁽³⁾。

解糖系で生じたジヒドロキシアセトンリン酸 (DHAP) は、浸透圧ストレスシグナルを受けて発現上昇した GPD によってグリセロール-3リン酸に変換され、次に GPP によって脱リン酸化されグリセロールになる。この2つの酵素がグリセロール生成の主要酵素である。GPDは補酵素として NAD を要求する NAD-依存性酵素で

あり、GPDとGPPにはそれぞれ別々の遺伝子によってコードされるアイソザイム GPD1, GPD2 および GPP1, GPP2 が存在する。これらのうち、急激な浸透圧変化に対応して発現が上昇するのは GPD1 と GPP2 であり、GPD2 と GPP は浸透圧対応でなく、嫌気的条件下で蓄積する NADH を NAD へと再酸化する働きをもつと考えられている⁽⁴⁾。

Moniliella megachiliensis とエリスリトール

S. cerevisiae と異なり、*M. megachiliensis* は高浸透圧下で多量のエリスリトールと少量のグリセロールを生成する。エリスリトールは、真核微生物ではペントースリン酸系路の中間産物であるエリスロース-4リン酸が EPP (erythrose-4-phosphate phosphatase, erythrose-4-phosphate kinase との説もある) の作用で脱リン酸化されてエリスロースに変換、さらに ER (erythrose reductase) で還元されて生成する (図2)。ペントースリン酸系路は解糖系と共役していることから、一部は解糖系を通して生成されると考えられる。したがって、エリスリトール生成には解糖系およびペントースリン酸系路の多くの酵素系がかかわるが、上記に加え解糖系とペントースリン酸系路の分岐点に存在し、炭素代謝のフラックスを制御する G6PDH (glucose-6-phosphate dehydrogenase)、ペン

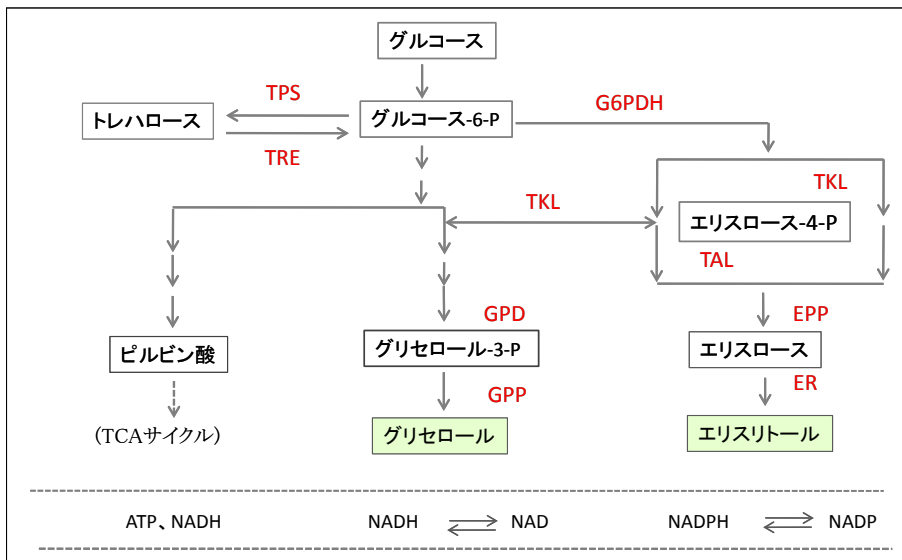


図2 ■ *M. megachiliensis*のポリオール生成と関連する主な酵素・補酵素系

G6PDH: glucose-6-phosphate dehydrogenase, GPD: glycerol-3-phosphate dehydrogenase, GPP: glycerol-3-phosphate phosphatase, TKL: transketolase, TAL: transaldolase, EPP: erythrose-4-phosphate phosphatase, ER: erythrose reductase, TPS: trehalose synthase, TRE: trehalase.

トース代謝系の主要酵素であるTKL (transketolase) およびTAL (transaldolase) などが鍵酵素と考えられる。なお、乳酸菌 *Oenococcus oeni* (ワイン醸造で malo-lactic 発酵を起こす) では、解糖系で生成したフルクトース-6-リン酸がPK (phosphoketolase) によってアセチルリン酸とエリスロース-4-リン酸に解裂し、後者がエリスリトール-4-リン酸を経てエリスリトールに変換されるという系が知られている。いずれにしても、自然界にエリスリトールを多量に生成する微生物は極めて希である。

シグナル伝達と MmHog1

Hog1は生命機能の根幹部分にかかわるタンパク質で、保存性が高いとされる。*M. megachiliensis*由来のHog1遺伝子 (*MmHog1*) は366個のアミノ酸からなり、その大部分を占める serine/threonine protein kinase catalytic domain中にリン酸化部位である TGYモチーフを有している。出芽酵母のそれ (*ScHog1*) とは79%の相同性をもつが、C末端領域のアミノ酸が55残基欠落している⁽⁵⁾。*M. megachiliensis*と同様に *Ustilago maydis*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* など、グリセロールに加えてマンニトール、アラビトール、エリスリ

トールなどの複数の適合溶質を生成する微生物のHog1は、*S. cerevisiae*をはじめとする子囊菌系酵母のそれよりもC末端が45~55アミノ酸残基短いという共通点が見られる。分類学的な差を示唆しているとも考えられ、興味深い。

*MmHog1*を出芽酵母の *hog1* 欠損株 (低浸透圧耐性) に導入したところ、浸透圧耐性の回復機能は出芽酵母本来の *Hog1* (*ScHog1*) 導入株を上回った。N末端側の大部分を占める catalytic domainの相同性は両者間で極めて高い。したがって、それより下流の common docking domain以下にその原因があるのではないかと想定し、common docking domainを含むC末端側約100アミノ酸残基を両Hog1の



間で互いに交換したキメラHog1を複製し、再度、浸透圧耐性の復帰を検討したところ、C末端側に*MmHog1*由来の配列をもつキメラHog1が、その逆のものより有意に高い復帰能を示した⁽⁵⁾。また、GFPを用いた核内移行後の滞留時間を検討した結果、*ScHog1*に比べて*MmHog*のほうが明らかに核内滞留時間が長く、結果的に高い浸透圧耐性回復能を示したものと推定した(投稿準備中)。さらに、滞留時間の長さは核内での脱リン酸化の遅れがその要因ではないかと考えているが、詳細は不明である。



ストレス応答に伴うエリスリトール生成系酵素の発現動態

ERはNADPH依存性のoxido-reductaseで、グリセルアルデヒドとエリスロースに対して高い特異性を示すことから、C4およびC3アルデヒドを還元するaldo-keto reductase familyに属する酵素であると推定されている⁽⁶⁾。ERには3種のisogene (*er1*, *er2*, *er3*)があるが、浸透圧負荷に応答して高発現するのは*er3*であり、*er1*, *er2*は浸透圧に関係なく常時一定レベルで発現する⁽⁷⁾。*er3*の5'上流プロモーター領域近傍の2カ所に、AGGG (CCCT) 配列が存在していた。この配列はSTRE (Stress Response Element) と呼ばれ、ストレスシグナル伝達にかかわる転写因子の

結合領域と考えられている。一方、*er1*および*er2*にはプロモーターからやや離れた領域(1,000 bp以上上流)に、それぞれ1個ずつSTREが存在していた。ストレス応答性はSTREの数が多いほど、数が同じであればプロモーターからの位置が近いほど高いことが出芽酵母などで知られており、本菌でも同様の結果となった。また、G6PDH, TKL, TALおよびGPDなどの酵素においても2~3個のisogeneが存在し、ストレス応答性の有無は同様に、STREの数と存在位置にはほぼ一致することが判明している(投稿中)。

ERのデータベース上の相同タンパク質はGPDではなく、GCY1 (galactose inducible crystalline-like protein)である。このGCY1はGPD同様、NAD-dependent aldo-keto reductaseでグリセロール代謝に関連する酵素だと考えられているが、その常態での役割は必ずしも明らかではない。耐熱性に関連する報告がなされていることから、おそらくは特殊な環境下で機能を発揮する酵素であろう。それではERを出芽酵母に導入すればエリスリトール生産を行うのだろうか。*S. cerevisiae*BY4741Δ*gcy1*に*er1*, *er2*, *er3*を遺伝子導入したところ、形質転換体は菌体内にER1, ER2, ER3を発現し、それらはいずれも*in vitro* assayでER活性をもつにもかかわらず、エリスリトールの*in vivo*生成は見られなかった⁽⁷⁾。このことから、出芽酵母にエリスリトール生成能がないのはERをも

たないことに加え、基質であるエリスロースが存在しないこと、すなわちエリスロース-4リン酸の脱リン酸化酵素EPPの欠落によると推定された。ただし、EPPの存在の確証は*M. megachiliensis*においてもいまだ得られていない。



ポリオールとトレハロースの代謝関連および適応戦略

*M. megachiliensis*は適合溶質として多量のエリスリトールと少量のグリセロールを生成するが、生成量の経時変化にはかなりのずれがある。1~4時間程度の短時間ストレス負荷では*gpd1*の発現量が*er1*, *er2*, *er3*のそれを大幅に上回り、グリセロールが優先的に生成される。しかし、対数増殖期である12時間後位から定常期(24時間、高浸透圧下では24~36時間)にかけて*er3*の発現が急激に増大し、それに伴って菌体内のエリスリトール蓄積量も増加する。一方、この間*gpd1*および*er2*, *er3*の発現量には大きな変化が見られない。このことより、本菌は浸透圧ストレスに対して、初期にはグリセロールを生成して緊急的に環境の急変に対応し、時間経過とともにエリスリトールに転換していくという、2段階の適応戦略をとっていると考えられた⁽⁷⁾。切り替えの要因は明らかではない。しかし、H₂O₂やメナジオンによる酸化ストレス負荷時には、初期でも



エリスリトールを高生産することから、ストレス負荷の時間継続に伴って生じるROS (Reactive Oxygen Species) がトリガーである可能性が高い。よく知られていることだが、ペントースリン酸系を経て生成する2モルのNADPHは、glutathione reductaseやSOD (superoxide dismutase) の補酵素としてROSの除去にかかわっており、また、エリスリトール生成にはNADPHが必要である。このように、生育ステージによって適合溶質を変化させる例は近年、*Candida*属酵母でも報告されている⁽⁸⁾。

また、*M. megachiliensis*はトレハロースやグリコーゲンのような貯蔵糖も少なからず生成する。出芽酵母のトレハロース含量は定常期で20% (菌体乾物当り) 前後とされるが、本菌ではこれを上回り30~35%にも達する。

定常期に到達しトレハロースを十分に蓄積した菌体を回収し、40%グルコース、1 M NaClを含む2%グルコースにさらしたところ、2時間以内にトレハロースの急減とともにグリセロールとエリスリトールが急増し、対象区(2%グルコース)のそれぞれ6~7倍、3~4倍に達した。一方、0.1 mMメナジオン処理区ではエリスリトール生成量が対象区の約10倍に達したのに対し、グリセロール生成量は対象区と大きな差は見られなかった。この間、ストレス負荷菌体ではグルコースの取り込みはほとんどなく、菌体自身の増殖も観察されなかったこと、エリスリトールの生成量とトレハロースの分解量はほぼ当量に当たることから、ポリオール含量の急激な増加はトレハロースやグリコーゲンのような貯蔵糖に由来するものと推定された (投稿

中)。トレハロースはタンパク質の変性防止および変性タンパク質の凝固防止能があり、熱、乾燥、凍結などから微生物を保護する働きがあることが知られている。しかし、浸透圧や酸化ストレスに対しても直接的な保護機能を有するとの報告は*S. cerevisiae*では見られない。一方、浸透圧、酸化ストレスへの保護物質として、あるいはそれらの結果として生成するポリオールが、貯蔵糖の一つであるトレハロースの代謝と密接な関連性を示唆する興味深い結果が*M. megachiliensis*で得られた。

ここまでの結果を基に、*M. megachiliensis*のストレスシグナル伝達と適合溶質生成過程の概略を図3に示した。

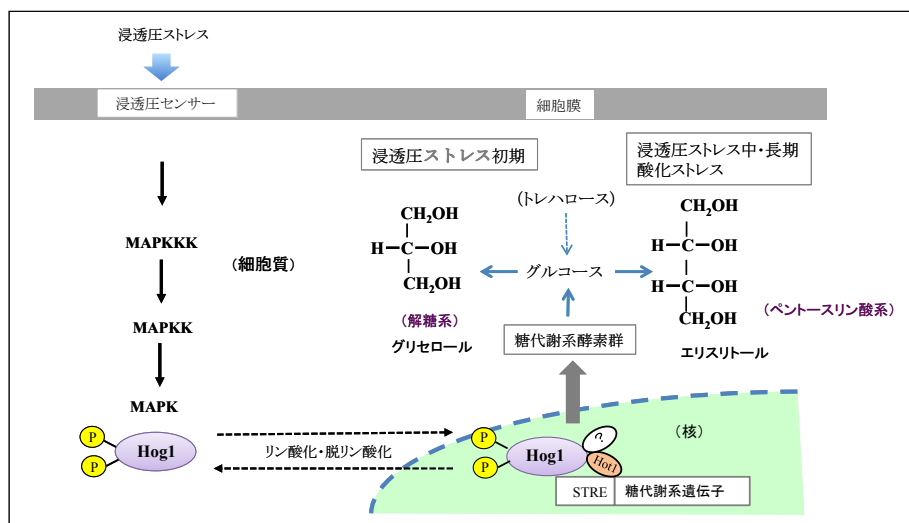


図3 ■ *Moniliella megachiliensis*の浸透圧シグナル伝達と適合溶質 (推定)



おわりに

浸透圧ストレス応答と適応戦略について、高度浸透圧耐性菌である *M. megachiliensis* を例にポリオール生成と糖代謝の観点から紹介した。糖代謝機構の解明と制御によるポリオールの収率向上を主目的としたものであるが、このような研究は以下のような分野への応用、発展が期待されるであろう。

1つ目は、酵母における浸透圧ストレス応答機構は、あらゆる生物のストレス修復機構のモデルとなりうることである。MAPキナーゼカスケードは哺乳類細胞にも何種類か存在するが、増殖因子などによって活性化されるERK経路と、ストレスやサイトカインによって活性化されるストレス応答MAPキナーゼ (SAPK) とに大別される。酵母のHOG1経路は哺乳類のSAPKと相同性が高く、高等動物のストレス刺激応答解明の手掛かりになることが期待される⁽⁹⁾。

2つ目に、適合溶質としての糖、ポリオール、アミノ酸 (その誘導体) などの中から、食品、医薬品、細胞・組

織の保護物質などに利用可能な有用物質が見いだされる可能性がある。適合溶質はストレス応答・制御のみでなく、傷害の治癒的な機能をもつ場合も多い。スクロース、トレハロース、グリシンベタインなどは適合溶質としての認識の有無にかかわらず、その有用性から広く利用されている。

3つ目は、ストレス修復機構の阻害や破壊による有害微生物の防除の可能性である。植物病原菌のいもち病菌は、グリセロールなどの適合溶質生成に伴って生じる細胞内の物理的圧力を用いて、細胞壁合成の制御を行いながらイネに侵入・増殖するとされている。このような圧力発生は浸透圧応答と密接に関連すると考えられ、植物病原菌や寄生菌で共通性があり、そのシグナル伝達機構の解明およびシグナル伝達を阻害する薬剤の開発などの研究が行われている⁽¹⁰⁾。

謝辞：本稿をまとめるに当たり、研究推進にご尽力いただいた大学院生、吉田潤次郎君、小林洋介君に感謝申し上げます。

- 1) 若生勝雄, 石塚博明, 久保直哉, 川口 嶽, 春見隆文, 林 清: 醸工, **66**, 217 (1988).
- 2) C. A. Rosa, S. Jindamorakot, S. Limtong, T. Nakase, M. A. Lachance, A. F. Jiménez, H. M. Daniel,

F. C. Pagnocca, J. Inácio & P. B. Morais: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **59**, 425 (2009).

- 3) S. Hohman: *Int. Rev. Cytol.*, **215**, 149 (2002).
- 4) R. Ansell, K. Granth, S. Hofmann, J. M. Threvelin & L. Adler: *EMBO J.*, **16**, 2179 (1997).
- 5) J. Yoshida, Y. Kobayashi, Y. Tanaka, Y. Koyama, J. Ogihara, J. Kato, J. Shima & T. Kasumi: *J. Biosci. Bioeng.*, **115**, 127 (2013).
- 6) T. Ookura, K. Azuma, K. Isshiki, H. Taniguchi, T. Kasumi & Y. Kawamura: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 944 (2005).
- 7) Y. Kobayashi, J. Yoshida, H. Iwata, Y. Koyama, J. Kato, J. Ogihara & T. Kasumi: *J. Biosci. Bioeng.*, **115**, 645 (2013).
- 8) R. S-Fresneda, J. P. G-Abad, A. Argüelles, P. G-Párraga, E. Valentin & J. C. Argüelles: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **430**, 1334 (2013).
- 9) E. de Nadal, P. M. Alepuz & F. Posas: *EMBO Reports*, **3**, 735 (2002).
- 10) T. Motoyama, K. Kadokura, T. Ohira, A. Ichiishi, M. Fujimura, I. Yamaguchi & T. Kudo: *Fungal Gen. Biol.*, **42**, 200 (2005).

(春見隆文, 日本大学生物資源科学部)



プロフィール



春見 隆文 (Takafumi KASUMI)

<略歴>1969年岐阜大学農学部農芸化学科卒業(農学博士名古屋大学)/卒業と同時に農林省園芸試験場,同食糧研究所(現食品総合研究所)研究員などを経て,2004年食品総合研究所理事長,2005年より現職.この間,1982~1983年米国アルバートアインシュタイン医科大学交流研究員,1986~1988年農林水産省本省勤務<研究テーマと抱負>微生物・酵素利用,特に糖質関連酵素とその利用にかかわる研究に一貫して携わってきました.最近では,ポリオールの代謝研究に取り組む中で,微生物が外界からのさまざまなストレスに呼応して繰り出す巧みな適応戦略に心を奪われています.人間世界のストレス対応にも適用できそうです<趣味>鎌倉由比ヶ浜には“さくら貝の歌”(八洲秀章作曲)の碑があります.そのさくら貝を拾い集め,コレクションやアートにして楽しんでいます