

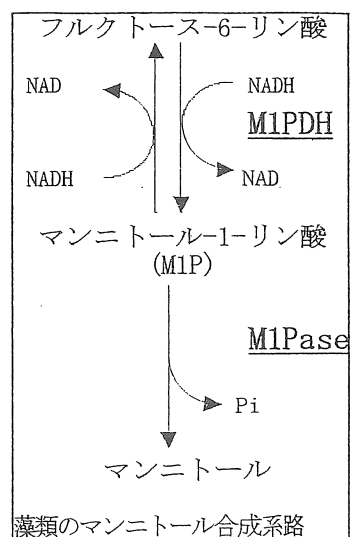
20

助成番号 0020

耐塩性獲得に寄与するマンニトール生合成関連酵素遺伝子のクローニング

助成研究者：岩本 浩二(筑波大学 生物科学系)
 共同研究者：猪川 倫好(上武大学 経営情報科学部)
 川野辺 英昭(秋田大学 教育文化学部)
 白岩 善博(筑波大学 生物科学系)

【目的】遺伝子導入によりマンニトール生合成機構を有用植物に付与し、耐塩性を付加する研究において、現在に至るまで大腸菌マンニトール-1-リン酸デヒドロゲナーゼ(M1PDH)遺伝子のみが導入されてきた。しかし、その耐塩性は低く、実用には更なる耐塩性の向上が必要とされる。そのため、マンニトール-1-リン酸フォスファターゼ(M1Pase)を導入し、代謝系をより活性化させる必要があると考えられる。ところが、M1Paseに関する知見は乏しく、植物ではM1Paseの遺伝子配列はおろか、酵素の単離・精製すら報告されていない。そこで本研究では広塩性紅藻アヤギヌよりM1Paseを単離し、M1Pase遺伝子のクローニングに必要な分子生物学的情報を得ることを目的とした。



【方法・結果・考察】本酵素は PEG-硫酸二相分配, 硫酸分画, Phenyl-Toyopearl, Butyl-Toyopearl, Sephacryl S-100, Mono-Q および Superdex200 による各種クロマトグラフィーにより SDS-PAGE 上で単一バンドを示すまでに精製された。その結果、サブユニット分子量 30kD の単量体からなるタンパク質であることが明らかとなった。また、等電点は 4.8 であり、至適 pH は 7.4 であった。本酵素は M1P を特異的な基質とし、その K_m 値は 0.41 mM を示した。また、本酵素の活性化には Mg^{2+} を必要とし、逆に Ca^{2+} 、高濃度の NaCl 及びマンニトールは活性を阻害した。以上の結果は、アヤギヌの M1Pase 遺伝子を植物に導入する際、以下の利点があることを示している。①中性域に至適 pH があるため細胞質で活性が保たれる②マンニトールの蓄積を細胞質に規定することができる③基質特異性が高いことから他の代謝系に影響を与えない④フィードバック調節により適量のマンニトールが作られる。

現在、N 末端及び内部アミノ酸配列の情報と本酵素に特異的な抗血清を用いて、アヤギヌ M1Pase の cDNA 塩基配列の決定を行っている。

20

助成番号 0020

耐塩性獲得に寄与するマンニトール生合成関連酵素遺伝子のクローニング

助成研究者：岩本 浩二 (筑波大学 生物科学系)

共同研究者：猪川 倫好 (上武大学 経営情報科学部)

川野辺 英昭 (秋田大学 教育文化学部)

白岩 善博 (筑波大学 生物科学系)

1. 研究目的

現在、不適切な灌漑や地球温暖化による海水面の上昇により、多くの土壌で塩類が集積し、その結果、耕作地の退廃が急速に進行している。そのため、近年、有用植物に耐塩性機構を付与する、もしくは強化することで耕作地の減少に対応する試みがなされている。現在、その戦略として以下の5つの方法が考えられている (坂本, 1999)。

- ①Na イオンの液胞・細胞外への分配機能の増強
- ②Na イオン流入抑制機能の強化
- ③翻訳調節因子による塩ストレス耐性カスケード増強
- ③活性酸素消去系酵素の増強
- ④塩誘導性タンパク質合成能の付与
- ⑤浸透圧調節物質合成能の付与

中でも“浸透圧調節物質”特に“適合溶質”と呼ばれる分子量が小さく、溶解度が大きく、代謝系に影響を及ぼさない物質の合成系を植物に付与することで、耐塩性を付加することが最も優れていると考えられている (Tarczynski *et al.* 1992)。実際、遺伝子組換えによってベタインやプロリン、ポリオール類等の合成系を導入した植物が作られ、耐塩性が向上したという報告がなされている (坂本, 1999)。本研究におけるマンニトール合成に関しても、遺伝子組換えによってマンニトールを蓄積能を獲得した植物が作られ、ある程度の成果が得られている (Tarczynski *et al.* 1992)。しかし、その耐塩性は、まだ充分とは言えず、実用には更なる耐塩性の向上が必要とされる。

マンニトール合成系を新たに付与する場合、今までの研究ではマンニトール合成系路のうち、M1PDH (大腸菌由来) 遺伝子のみが導入されてきた。そのため、組換え体ではM1P からマンニトールへの代謝は、非特異的なフォスファターゼが代謝していると考えられている (Tarczynski *et al.* 1992)。しかし、非特異的なフォスファターゼではその基質特異性やマンニトールの局在等、不都合な点がある。したがって、更なる耐塩性向上のためには M1Pase 遺伝子の導入

が必要と考えられる。しかし、M1Paseの分子情報については、近年になって、寄生性生物アピコンプレクサの *Eimeria tenella* において cDNA 配列が示された以外は酵素タンパク質の単離を含めて全く不明の状態である。また、*E. tenella* の M1Pase についても詳しい酵素学的性質はいまだに示されていない (Liberator *et al.* 1998)。そこで、本研究では、植物由来の M1Pase を精製・単離し、その酵素学および分子生物学的諸性質を明らかにすると共に、M1Pase に特異的な抗体の作成や、N 末端および内部アミノ酸配列の解明等 cDNA クローニングに寄与する情報を得ることを目的とした。

2. 研究方法

2.1 材料

紅色植物門イギス目に属するアヤギヌ (*Caloglossa continua* (Okamura) King et Puttock) は千葉県木戸川河口で採取した。アヤギヌ以外の藻体等大きな夾雑物を取り除いた後、使用するまでディープフリーザー (-80°C) で保管した。

2.2 M1Pase の精製

藻体 300 g を 5 % (w/v) 硫酸, 1 % (w/v) polyvinylpyrrolidone K-90, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM benzimidazole-HCl, 10 mM 6-aminocaproic acid, 5 mM MgCl₂, 2 mM Na₂-EDTA, 4 mM 2-mercaptoethanol (2-ME), 500 mM HEPES-KOH (pH 7.0) を含む抽出用緩衝液 900 mL 中で破碎した後、遠心上清を得た。この粗抽出液を polyethylene glycol (PEG)-硫酸を用いた二層分配法 (Nakamura and Ikawa 1993) により色素タンパク質等の夾雑物を除き、硫酸沈殿 (9 % - 100 % 飽和) 後、phenyl-Toyopearl および butyl-Toyoperal による疎水クロマトグラフィー、Sephacry 1 S-100 によるゲルろ過クロマトグラフィー、MonoQ による陰イオン交換クロマトグラフィー、そして Superdex 200 HR によるゲルろ過グラフィーを行うことにより精製標品を得た。

2.3 活性測定

M1Pase の活性は M1P のマンニトールへの代謝に伴い放出される遊離のリン酸量を定量することで測定した (Ikawa *et al.* 1972, Saheki *et al.* 1985)。タンパク質量は色素結合法を用いて測定した (Iwamoto *et al.* 1996)。

2.4 電気泳動, 免疫染色

SDS 電気泳動, ウエスタンブロッティング, 免疫染色は定法に従った (Iwamoto et al 1996). 等電点電気泳動は固定化 pH ゲルにより, 等電点電気泳動システムを用いて行った (Multiphor II; Amersham Pharmacia Biotech).

2.5 抗 M1Pase 血清の作成

精製した酵素タンパク質を SDS 電気泳動によりさらに精製した後, 対応するペプチドバンドを含むゲルをアジュバント・コンプリートと混和し, モルモットの皮下に注射した. 一ヶ月後, 同様に調製した M1Pase-アジュバント・インコンプリートを注入し, 数日後, 試採血を行い抗体の力価を測定した. この操作を力価が充分上昇するまで繰り返した後, 全採血を行い抗血清を得た.

2.6 N 末端および内部アミノ酸配列の決定

内部アミノ酸配列を決定するため, クリーブランド法を用いて M1Pase を制限的に分解し, 得られた断片の N 末端のアミノ酸配列を決定した. N 末端および内部アミノ酸配列はエドマン分解により末端アミノ酸を遊離・分析することで行った (Iwamoto et al 1996).

3. 研究結果

3.1 M1Pase の精製

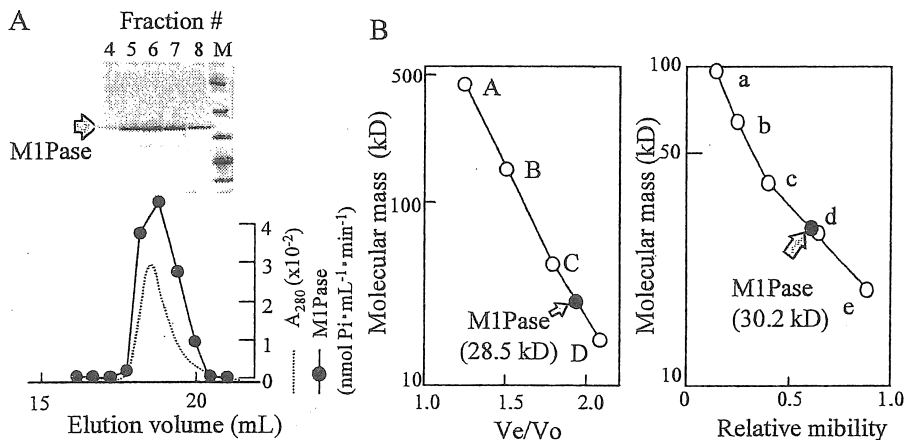


FIG. 1. A: Elution profiles of the M1Pase activity and protein from Superdex 200 HR. ●, M1Pase activity; ···, concentration of protein. B: Estimation of molecular masses of the native form (left) and the subunit (right) of M1Pase from *C. continua* by a gel filtration and SDS-PAGE, respectively. Molecular weight markers (kDa): A, apoferritin (443); B, alcohol dehydrogenase (150); C, egg albumin (45); D, myoglobin (17.6), a, phospholylase b (94), b, bovine serum albumin (67), c, egg albumin (43), d, carbonic anhydrase (30), and e, trypsin inhibitor (20.1).

精製の結果、最終的に Superdex 200 HR によるゲルろ過クロマトグラフィーにより、比活性は $62.5 \mu\text{ moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$ にまで上昇した。これは粗抽出液における活性の約 90 倍に相当する。また、活性とタンパク質の溶出ピークが一致し (Fig 1A)、また、SDS 電気泳動の結果、そのピークにおいて、単一のタンパク質バンドが得られたことから (Fig 1A)、完全精製が達せられたことが分かった。また、このゲルろ過クロマトグラフィーからホロタンパク質の分子量が 28.5 kD であり (Fig 1B)。さらに、SDS 電気泳動からサブユニット分子量が 30.2 kD であることが示された (Fig 1B)。ホロタンパク質の分子量およびサブユニット分子量から、本酵素は単量体で機能していることが明らかとなった。

3.2 M1Pase の酵素学および分子的諸性質

3.2.1 至適 pH および等電点

M1Pase 活性における pH の影響を調べた結果、至適 pH は 7.4 であり、pH 6.5 ~ 8.0 の中性域における pH の範囲で最大活性の 60% 以上の活性が保たれていた (Fig 2A)。したがって、本酵素は細胞質で最大の活性を示すことが分かった。また、本酵素の等電点は 4.8 であった。

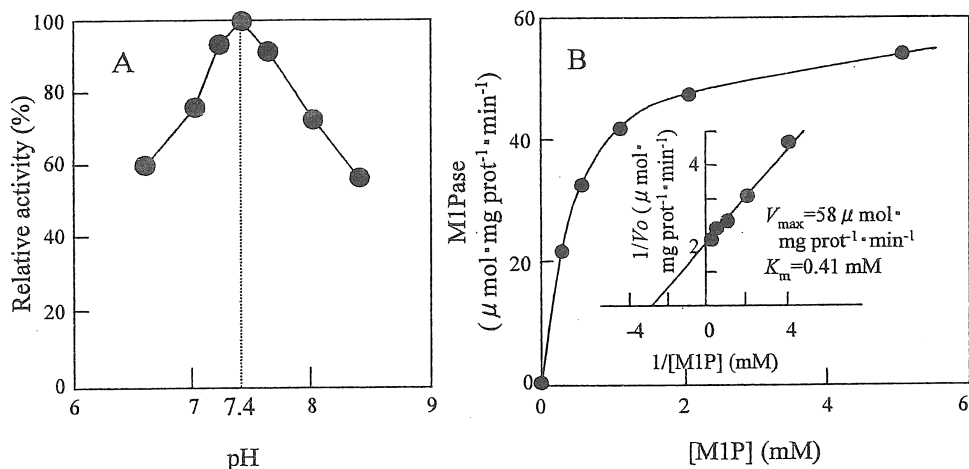


Fig 2. A: pH-profile of the activity of the purified M1Pase from *C. continua*. The pHs of the reaction mixture were adjusted with $10 \mu\text{ mol}$ of Bis-Tris-Propane buffer. B: Kinetic analysis of M1Pase purified from *C. continua* by a plot of the activity versus the substrate concentration and its double-reciprocal plot (insert).

3.2.2 基質特異性および基質親和性

本酵素の基質特異性は極めて狭く、M1P以外の基質は Sorbitol-6-P 以下ほとんど代謝しないことが分かった (Table 1)。さらに、M1P に対する基質親和性は 0.41 mM であった (Fig 2B)。

Table 1. Substrate specificity of the purified M1Pase from the red alga *C. continua*.

Substrate ^a	Relative activity (%)
Mannitol-1-P	100 ^b
Sorbitol-1-P	2.3
Fructose-6-P	1.8
Ribose-5-P	0.4
Mannose-6-P	0.3
Glucose-1-P	0
Glucose-6-P	0
Fructose-1, 6-BP	0
α -Glycerophosphate	0
<i>p</i> -Nitrophenyl phosphate	0

^a The concentration of substrate was 0.5 mM.

^b The activity in the control was $42.4 \mu \text{mol} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

3.2.3 阻害剤・金属イオン等の影響

阻害剤の存在下では M1Pase は一般的なフォスファターゼの阻害剤である

Table 2. Effect of various cations and inhibitors on the activity of purified M1Pase from the red alga *C. continua*. The enzyme solution was dialyzed against buffer containing 100 mM HEPES-KOH, 1 mM benzamidine-HCl, 10 mM 6-aminocaproic acid, 4 mM 2-ME, and 20% (w/v) glycerol, pH 7.0 to eliminate the effects of other metals.

Compound	Concentration (mM)	Relative activity (%)
No addition	-	0
MgCl ₂	1	100 ^a
CoCl ₂	1	66
MnCl ₂	1	29
ZnCl ₂	1	0
NaF ^b	1	8.5
NEM ^b	1	0
	0.1	21.0
<i>p</i> -HMB ^b	0.1	0
	0.01	0

^a The activity in the control was $42.4 \mu \text{mol} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

^b Enzyme activities were assayed in the presence of 1 mM MgCl₂.

NaF の他, SH 酵素の阻害剤として知られる *N*-ethylmaleimide (NEM) や *p*-hydroxymercuribenzoic acid (*p*-HMB) に強く阻害された (Table 2). このことから活性には SH 基が関与することが示唆された. また, 本酵素の活性には特定の 2 価の陽イオンを必要とし, 特にマグネシウムイオンは酵素の活性化に最も効果的に作用することが分かった (Table 2). マグネシウムイオンの効果は 0.1 mM から急激に増加し 1 mM でほぼ飽和した (Fig 3A). マグネシウム

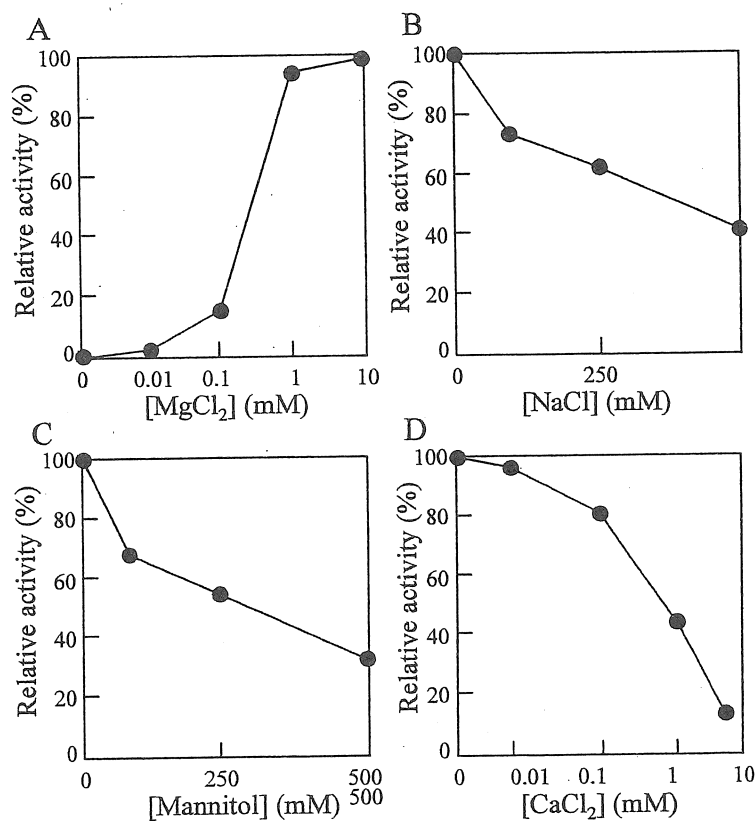


FIG. 3. Effects of the activity of M1Pase purified from *C. continua* on the concentrations of $MgCl_2$ (A), $NaCl$ (B), mannitol (C) and $CaCl_2$ (D).

の他, コバルトやマンガンも M1Pase の活性に寄与したが, 亜鉛では活性化作用が認められなかった (Table 2). さらに, 本酵素の活性は高濃度の $NaCl$ やマンニトールにより阻害されることが分かった (Fig 3B, C). また, Ca イオンも M1Pase の活性を強く阻害した (Fig 3D).

3.3 N 末端および内部アミノ酸配列

V8 プロテアーゼで M1Pase を制限的に分解し, その断片および N 末端の配列を得た (Fig 4).

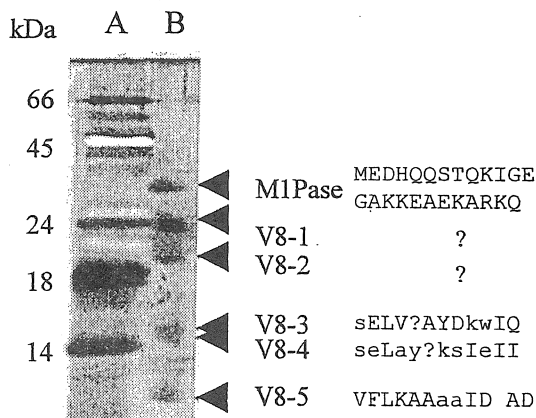


Fig 4. Determination of N-terminal and internal amino acids sequences. Lane M, Molecular mass markers (kDa) including bovine serum albumin (66), egg albumin (45), trypsinogen (24), β -lactoglobulin (18.4), and lysozyme (14.3). Lane B, purified M1Pase. In the text, small letters and a question mark indicate amino acid residues in doubt and not-identified noe, respectively

3.4 抗 M1Pase 血清

モルモットを用いて抗 M1Pase 血清を得た (Fig 5)。免疫染色の結果、精製標品で M1Pase のサブユニット分子量に相当する位置で、単一のバンドが確認されたことから、血清と M1Pase タンパク質が反応することが確認された。また、粗抽出液を用

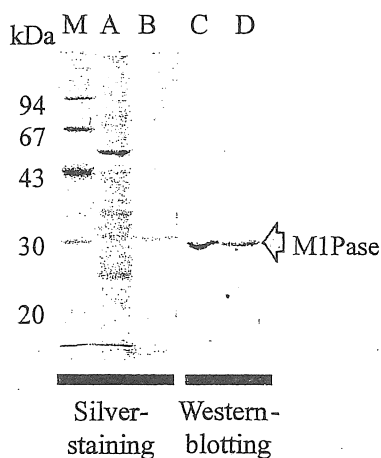


Fig 5. SDS-PAGE and a Western blot analysis of M1Pase from *C. continua*. Lanes M, A and B, silver staining; lane C and D, immunodetection by the antibody raised against the M1Pase. Lanes A and C, crude extract from *C. continua* ($5 \mu\text{g/lane}$). Lanes B and D, purified M1Pase ($5 \mu\text{g/lane}$). Lane M, Molecular mass markers (kDa) including phosphorylase b (94), bovine serum albumin (67), egg albumin (43), carbonic anhydrase (30), and trypsin inhibitor (20.1).

いた同様の解析においても、蛋白染色では多数のバンドが検出されたのにも関わらず、免疫染色で精製標品と同じ場所にバンドが確認されたことから、本酵素に特異的な抗体が作成されたことが分かった。

4. 考察

本研究で用いたアヤギヌ *Caloglossa continua* は紅色植物門イギス目に属する藻類で、東北以南の太平洋岸河口域に広く見られる藻体数 cm 程の海藻である。河口域は潮の干満の影響により、満潮時には海水環境、干潮時には淡水環境となるため、本藻は幅広い塩環境に適応している。さらに、潮の引ききった状態では、藻体は水面から完全に露出することから、乾燥状態に対する耐性をも有する。アヤギヌ属は、紅色植物でも例外的にマンニトールを適合溶質として蓄積することが知られている。また、本属のマンニトール合成経路は陸上植物のものとは異なり M1PDH を保有することから、M1Paseの基質となる M1P は F6P から直接代謝される。したがって、アヤギヌ属は植物のマンニトール合成経路に関する研究には適した研究材料と考えられる。

本研究においてアヤギヌの M1Pase の完全精製が達せられた。一般的に、紅藻類は多量のフィコビリタンパク質や糖類を含み、それらが精製の妨げとなるため、精製には非常な困難が伴う。今回、精製の早い段階で、PEG-硫酸処理により、酵素と夾雑物が分離できたことが、精製成功の最大の要因となったと考えられる。本研究は光合成生物における M1Pase 精製の初めての報告である。光合成生物以外の M1Pase については、近年、寄生性生物アピコンプレクサの *Eimeria tenella* で cDNA 配列が示された (Liberator *et al.* 1998)。しかし、*E. tenella* の M1Pase の詳しい酵素学的性質はほとんど示されていない。本研究で明らかにされたアヤギヌ M1Pase の N 末端および内部アミノ酸配列を Genbank のデータベースで検索をかけた結果、いずれの配列も *E. tenella* の M1Pase とは相同性が認められなかった。このことから、アヤギヌと *E. tenella* の M1Pase タンパク質は系統を異にするタンパク質であることが明らかとなった。

M1Pase の酵素学的諸性質については、部分精製や粗抽出標品ではあるが、菌類や褐藻、陸上植物でいくつかの報告がある。アヤギヌ M1Pase の酵素学的性質は基質特異性の点で菌類 *Penicillium notatum* の M1Pase とは異なり (Boonsaeng *et al.* 1976)、また至適 pH や基質親和性の点で陸上植物 *Thesium humile* の M1Pase とは異なる性質を有していた (Simier *et al.* 1994)。しかし、本藻の酵素は至適 pH、基質特異性、 Mg^{2+} や Mn^{2+} による活性化、NEM や *p*-HMB、NaF により強く阻害される

という点で褐藻 *Spatoglossum* および *Dictyota* の M1Pase と極めて類似した性質を持つことが明らかとなった (Ikawa et al. 1972).

また、本酵素の活性は高濃度の NaCl やマンニトールにより阻害されることが分かった。NaCl については、一般的な塩による活性阻害と考えられる。一方、マンニトールに関しては生成物阻害であり、過剰のマンニトールの合成・蓄積を防ぐため、マンニトールの生合成調節が酵素レベルで行われている可能性が示唆された。しかし、500 mM マンニトール存在下でも約 30 % の活性が維持されていることから、生合成量調節のためには基質である M1P 量の調節、すなわち、M1PDH の活性による調節がより大きく関与するのではないかと考えられる。また、Ca²⁺による強い活性阻害および Mg²⁺による急速な活性化から、金属イオンが関与する調節機構が存在する可能性も残されている。ところで、植物ではマンニトールの合成・蓄積は細胞質で行われていることが知られている (Rumpho et al. 1983)。本酵素が中性領域の pH で広く活性を保持していることは、アヤギヌ M1Pase が細胞質で機能するのに適していることを示すものである。ところで、*E. tenella* における M1Pase の至適 pH は 6 であることが示されており、アヤギヌ M1Pase と大きく異なる。マンニトール合成関連遺伝子導入による耐塩性植物の分子育種を行う場合、細胞質に M1Pase を発現させることでマンニトールを細胞質に局在させることが可能となる。植物の細胞質の pH 環境を考慮すると、この点において、アヤギヌ M1Pase は *E. tenella* の M1Pase より優れていると考えられる。さらに、アヤギヌの M1Pase の遺伝子を導入することにより、基質特異性が高いことから他の代謝系に影響を与えないことや、マンニトールによるフィードバック調節によりマンニトールの合成量が酵素レベルで制御される等の利点がある。

5. 今後の課題

本研究では M1Pase の cDNA 配列決定に大きく寄与する N 末端および内部アミノ酸配列が明らかにされた。また、特異的な抗血清も得られた。今後はこれらを用いて M1Pase の cDNA 配列決定を行う必要がある。また、本研究において、マンニトールの生合成量調節には M1PDH が大きく関与していることが明らかとなった。マンニトール生合成の調節機構の解明は、マンニトール蓄積のメカニズムを解明することに他ならないことから、マンニトール蓄積による耐塩性向上を研究する上で必要不可欠な問題である。したがって、今後、アヤギヌの M1PDH の精製および cDNA の配列決定を含む分子的諸性質の解明が求められると思われる。

6. 文献

- Boonsaeng, V., Sullivan, P.A., and Shepherd, M.G. (1976). Mannitol production in fungi during glucose catabolism. *Can J Microbiol* 22:808-816.
- Ikawa, T., Watanabe, T., and Nisizawa, K. (1972). Enzymes involved in the last steps of the biosynthesis of mannitol in brown algae. *Plant Cell Physiol* 13:1017-1029.
- Iwamoto, K., Suzuki, K., and Ikawa, T. (1996). Purification and characterization of glycolate oxidase from the brown alga *Spatoglossum pacificum* (Phaeophyta). *J Phycol* 32:790-798.
- Liberator, P., Anderson, J., Feiglin, M., Sardana, M., Griffin, P., Schmatz, D., and Myers, R.W. (1998). Molecular cloning and functional expression of mannitol-1-phosphatase from the apicomplexan parasite *Eimeria tenella*. *J Biol Chem* 273:4237-4244.
- Nakamura, Y., and Ikawa, T. (1993). Purification and properties of NADH: nitrate reductase from the red alga *Porphyra yezoensis*. *Plant Cell Physiol* 34:1239-1249.
- Rumpho, M.E., Edwards, G.E., and Loescher, W.H. (1983). A pathway for photosynthetic carbon flow to mannitol in celery leaves. Activity and localization of key enzymes. *Plant Physiol* 73:869-873.
- Saheki, S., Takeda, A., and Shimazu, T. (1985). Assay of inorganic phosphate in the mild pH range, suitable for measurement of glycogen phosphorylase activity. *Anal Biochem* 148:277-281.
- 坂本 敦 (1999) 耐塩性の遺伝子工学. 遺伝 53: 68-74.
- Simier, P., Renaudin, S., and Fer, A. (1994). Characteristics of the mannitol pathway in a root hemiparasitic species, *Thesium humile* Vahl. (Santalaceae). *J Plant Physiol* 143:33-38.
- Tarczynski, M.C., Jensen, R.G., and Bohnert, H.J. (1992). Expression of a bacterial *mtD* gene in transgenic tobacco leads to production and accumulation of mannitol. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:2600-2604.

The Molecular Cloning of Enzymes Catalyzing the Biosynthesis of Mannitol that Contribute to the Salt Tolerance in Plants

Koji IWAMOTO¹, Tomoyoshi IKAWA², Hideaki KAWANOBE³,
and Yoshihiro SHIRAIWA¹

¹Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba

²Faculty of Education and Human Studies, Akita University

³Faculty of Management and Information Sciences, Jobu University

Summary

Recently some attempts have been made to produce the salt tolerant transgenic plant by introducing the mechanism of mannitol biosynthesis. Though the transgenic plant accumulated the mannitol and showed the salt tolerance to some extent, the tolerance of the plant was not strong. There is a need to increase the salt tolerance of plants. The authors proposed, one of the solutions, to transfer the gene of mannitol-1-phosphatase (M1Pase) to be added to the gene of mannitol-1-phosphate dehydrogenase (M1PDH) that had only been transferred in former studies. M1Pase plays an important role in plant mannitol metabolism, because it catalyzes the final step of mannitol biosynthesis, M1P to mannitol. However, there is no information on molecular properties of M1Pase from plant. In this study, the authors intended to purify the M1Pase and to have some molecular information required to determine the cDNA sequences of M1Pase from the red alga *Caloglossa continua* (Okamura) King et Puttock.

The enzyme was purified by the combination of aqueous two-phase partitioning method with polyethylene glycol-ammonium sulfate, ammonium sulfate precipitation, and chromatographies on phenyl-Toyopearl, butyl-Toyopearl, Sephacryl S-100, Mono-Q, and Superdex 200 HR. The enzyme was shown to be a monomer, since gel-filtration and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis gave close values of apparent molecular weights of 28,500 and 30,200, respectively. The protein exhibited an isoelectric point of 4.8. The substrate specificity for mannitol-1-phosphate (M1P) was very high, and that for K_m (M1P) was 0.41 mM. The catalytic activity was optimal at pH 7.4. The enzyme was activated by Mg^{2+} , but was strongly inhibited by Ca^{2+} , NaF, *N*-ethylmaleimide, and *p*-hydroxymercuribenzoic acid. Seawater levels of NaCl and physiological levels of mannitol also inhibited the activity by 50% or more. Changes in the concentrations of those ions and metabolites may regulate the biosynthesis of mannitol as an osmoregulant *in vivo*.

These findings were revealed for the advancement in transferring the gene of M1Pase, because the enzyme will be active in the cytosol that is with neutral pH condition, and the accumulation of mannitol in the cytosol can be controlled. The enzyme would not influence the metabolic system since it is highly specific to M1P and feedback regulation of the enzyme activity by the mannitol maintains its concentration at a proper level.