

「極限環境状態における現象」
平成9年度採択研究代表者

今中 忠行

(京都大学大学院工学研究科 教授)

「深度地下極限環境微生物の探索と利用」

1. 研究実施の概要

深度地下極限環境(高温、高圧、無酸素、貧栄養)は古くから無菌状態であると信じられていたため、その生態系に関する研究は地表生態系と比べて大幅に遅れている。しかし、我々はすでに超好熱菌、嫌氣的石油分解菌など地下から地表に出現したとも予想される興味深い微生物を分離しており、深度地下には未知の生物が多種類存在している可能性が示唆されている。本研究ではこの未開拓の深度地下極限環境から新規な微生物を分離し、それらが有するであろう特殊酵素、代謝系や環境適応戦略を解析していくことを第一の目標に設定している。これにより地下微生物生態系の解明、生命進化過程の理解、遺伝子資源の確保、工業的利用や環境改善への貢献などを期待している。

2. 研究実施内容

この一年間の主な研究成果として以下のものが挙げられる。

(1) *Thermococcus kodakaraensis* KOD1株由来の超耐熱性酵素の同定と解析

DNA ligaseの生化学的解析：DNA ligaseは2つのDNA断片の末端を結合させるという遺伝子組換え技術の中で不可欠な酵素でありながら、従来から使用されている細菌やファージ由来酵素のほとんどが熱に弱く、不安定なものである。また、真核生物(ATP依存型)、細菌(NAD依存型)、ウイルス(ATP依存型)などから多数のDNA ligaseが今までに同定・解析されてきたが、始原菌のDNA ligaseについては全く報告例がなかった。そこで我々は、超好熱始原菌*Thermococcus kodakaraensis* KOD1のDNA ligase 遺伝子をゲノム解析により取得し、その一次構造を明らかにした。配列の比較から、*T. kodakaraensis* KOD1のDNA ligase(*Tk-Lig*)はATP依存型であることが予想された。*Tk-Lig*の酵素学的性質を明らかにするために、*Tk-lig* 遺伝子を発現用ベクターにクローニングし、大腸菌を宿主として大量発現を試みた。得られた組換え型酵素は各種クロマトグラフィーによって精製することができた。分子量を求めたところ、本酵素は単量体であることが明らかになった。また、反応特性について検討した結果、ATP、 Mg^{2+} を添加した際に高いDNA ligase活性が観察

された。またK⁺には反応促進効果が認められ、反応最適pHは8.0であった。本酵素は鋳型なしの活性は検出されなかったため、二重鎖DNAを基質とすることが判明した(図1)。

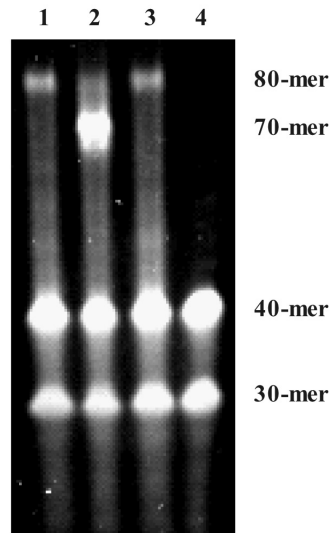


図1 . *Tk-Lig*のDNA ligase活性。
80 bの1本鎖DNAを鋳型とした際の30 b、40 bの1本鎖DNAの結合を指標に活性を測定している。
Lane 1は反応前、lane 2は反応後、lane 3はATP無添加、lane 4は鋳型無添加。

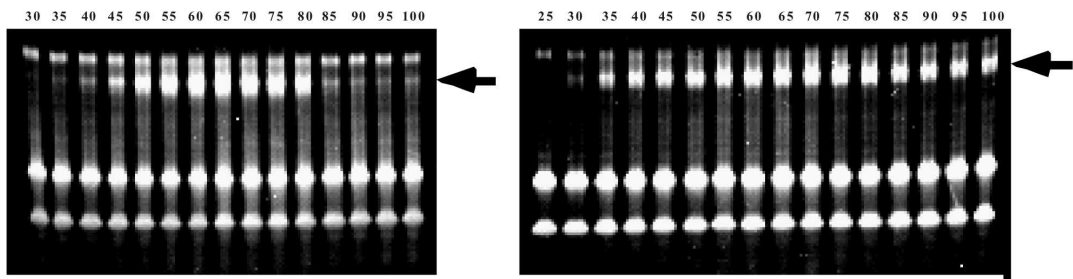


図2 . 異なる濃度における*Tk-Lig*の温度依存性。左は20nM、右は200nMでの活性測定。矢印は生成物の70-merを示す。

*Tk-Lig*は2つの興味深い特性を有した。20 nMの酵素濃度では35 から80 の間に顕著なDNA ligase活性が検出された(図2)。80 は基質に用いたオリゴヌクレオチドの変性温度(T_m)であり、この温度で酵素活性が急激に低下することは予想された。しかしながら、酵素濃度を200 nMに上昇させた際、30 から100 においてDNA ligase活性が見られた(図2)。基質DNAの T_m 値以上の高温下においても活性が見られたことから本酵素には二本鎖DNAを安定化する機構を有していることが推測された。もう1つの特徴は本酵素はATP依存型の酵素であるにもかかわらず、弱いながらもNAD依存型のDNA ligase活性も有した(図3)。これらのような特徴をもつDNA ligaseは他に報告例はなく、*Tk-Lig*の構造学的特徴や反応機構の解明が期待される。

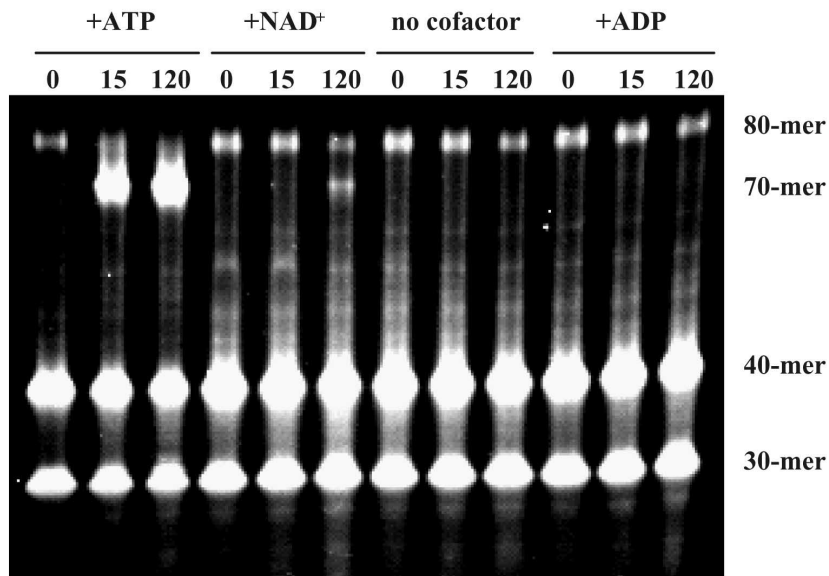


図3 . *TK-Lig*のcofactor特異性。ATP、ADP、NADなどを用いた際のDNA ligase活性を測定した。ATP添加時には顕著なDNA ligase活性が検出され、NAD添加時に弱いながらも活性が検出された。ADP添加時には活性は検出されなかった。

Lon protease: 本来、タンパク質分解反応は自発的に起こりうる反応である。代表的なタンパク質分解酵素としては消化酵素であるトリプシン、ペプシン、キモトリプシン等がある。それに対してLon proteaseは初めて確認されたATP依存型のプロテアーゼであり、細菌から真核生物まで、生物界に広く存在する酵素である。一種類のサブユニット中にATPase活性ドメインとprotease活性ドメインを合わせ持つ。その配列中には典型的なプロテアーゼ類に見られるような保存された活性中心は存在しなかったが、セリンプロテアーゼの阻害剤であるDFP (diisopropyl fluorophosphate) によって僅かに阻害を受けることから、セリンプロテアーゼであることが示唆された。その後の変異の挿入による研究から、活性中心はSer-Lys残基によるcatalytic dyadを形成すると考えられている。大腸菌内では、外界のストレスにより生じた変性タンパクのATP依存的な分解や、特定のタンパク質を時期特異的に積極的に分解するという機能が明らかとなっている。

KOD1株のゲノム解析からLon proteaseと相同性のある遺伝子断片が得られたので、始原菌における本遺伝子様の存在が示唆された。そこで、これまでに研究されていない始原菌内でのLon proteaseの生理的役割の解明とともに、ATP依存型プロテアーゼの機能制御に注目して研究を進めた。*Tk-lon*の予想される全塩基配列を決定した結果、*Tk-lon*は1905bp, 635aaからなる分子量約

70kDaと推定されるタンパク質をコードしており、これまでに調べられている大腸菌のLon protease (*Ec*-Lon)と同様にその配列上にはATPase活性部位と考えられるWalker motif、そしてpeptidase活性部位が存在していることが明らかになった。Peptidase活性中心付近の配列も、細菌、真核生物の間で保存されているSer678, Thr703, Gly704, Lys721, Pro736が*Tk*-Lonにおいて保存されており、一次構造上は既知のLon proteaseの特徴を有していた。また、アミノ酸配列は大腸菌のLon proteaseと34%、ヒトのLon proteaseとは30%の相同性を示していた。

本遺伝子が本当にproteaseをコードしているかを生化学的に解析するために、*Tk*-lonの過剰発現を試みた。その結果、発現産物は可溶性タンパクとして得られた。熱処理後、組換え型*Tk*-Lonは大腸菌由来のタンパク質とともに沈殿画分に回収されたが、それは熱変性によるものではなく界面活性剤などを利用することによりその精製にも成功した。*Tk*-Lonの酵素学的性質を調べた結果、本酵素はATP非存在下でもタンパク質分解活性を有することが判明した。驚くべきことに、ATP添加時にはむしろ活性の低下が観察された(図4)。現在このような特異な性質を有する*Tk*-Lonの生理的役割について検討している。

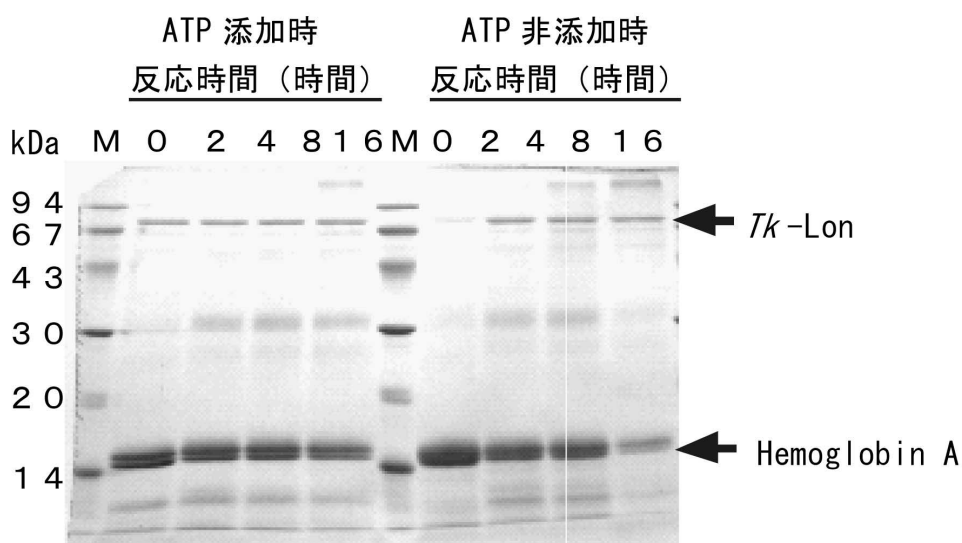


図4 . Hemoglobinを基質とした際の*Tk*-Lonのタンパク質分解活性。
反応温度は70 で活性測定を行っている。

Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase / oxygenase(Rubisco)の立体構造解析:
リブローズビスリン酸カルボキシラーゼ(Rubisco)は、リブローズビスリン酸にCO₂を付加する反応を触媒し、炭酸固定(カルビン回路)の鍵酵素とし

て知られている。我々は、前年度までに *T. kodakaraensis* KOD1株由来の Rubisco (*Tk*-Rubisco) が、新規な十量体 (五角形) 構造を有することを明らかにした。本酵素の結晶化にも成功し、その立体構造解析を進めている。現時点ではその主鎖の立体構造までが解明されている (図5)。また、KOD1株の生育温度を含めた高温下での *Tk*-Rubisco の構造情報は得られていなかったため、*Tk*-Rubiscoの立体構造が温度によりどのように変化するかを明らかにすることとした。精製した *Tk*-Rubisco に対し、温度を変化させて、ゲルろ過クロマトグラフィー、Circular Dichroism、Differential Scanning Calorimetry 解析を行った。ゲルろ過クロマトグラフィーでは *Tk*-Rubisco は 20、30、40、50、60、70、80、85、90、95、99 において同一の分子量を示し、Circular Dichroism の変化も観察されなかった。Differential Scanning Calorimetry 解析の結果から、変性温度と予想される 120 まで大きな熱変化は観察されず、以上の結果より、*Tk*-Rubisco は高温下でも十量体構造を維持し、また、温度に依らず安定した立体構造を保持することが明らかになった。このことは、現在進めている X 線立体構造解析の結果が、*Tk*-Rubisco の高温下での立体構造をも反映し得ることを強く示唆している。

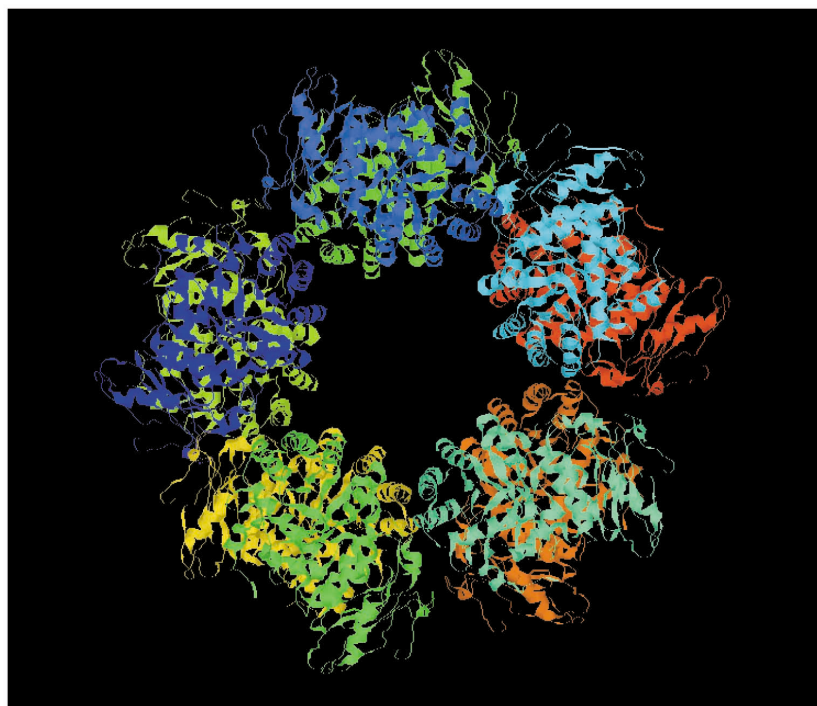


図5. *Tk*-Rubisco の主鎖の立体構造。

Histone: 95 以上で生育する超好熱菌は核酸を高温融解から守る特殊な防護システムを有する。これまで染色体DNAのGC含量の高さが熱安定化の

大きな要因と考えられていたが、超好熱菌の多くは必ずしも高GC含量の染色体DNAを有していない。特に *Thermococcales* に属する超好熱菌の多くは染色体DNAのGC含量が38%以下であり、エネルギー的には極めて不安定と考えられる。超好熱菌のヒストンは、DNAに結合することでDNAをコンパクト化し、高温環境でのヌクレオソーム様構造の維持に関与していると考えられる。また、超好熱菌の細胞内には様々なポリアミンやカリウムイオンが存在するが、これらも核酸の安定化に寄与していると考えられている。これら低分子物質の添加が、ヒストンのDNAコンパクト化にどのような影響を与えるかを調べることを目的として *in vitro* で添加効果を検討した。

KOD1株には2種類のヒストン(HpkA、HpkB)が存在する。これらはいずれも系統的に真核細胞のヒストンH4に近縁であり、ヒストンH4のコアドメインを有する。 *hpkA*、*hpkB* 遺伝子をそれぞれ大腸菌内で大量発現させ、組換えタンパク質としてHpkA、HpkBを精製した。アクリルアミドゲルを用いたゲルシフト法によりDNAへの結合を、アガロースゲルによりDNAのコンパクト化を検討したところ、いずれもDNAに結合し、コンパクト化することが示された。つぎにHpkAを用いて、ポリアミンやカリウムイオンがそのコンパクト化にどのような影響を与えるかを検討した。75 °C以上ではHpkAだけではコンパクト化された構造は維持されないが、ポリアミン(プタレスシン、スペルミジン、スペルミン)の添加により、コンパクト化はさらに促進され、その構造はさらに高温でも安定に維持された。尚、コンパクト化の促進効果はポリアミンの価数が増えるに従い強まり、スペルミンが最も効果的であった。一方、アセチル化されたポリアミン(アセチルプタレスシン、アセチルスペルミジン、アセチルスペルミン)を添加した場合、コンパクト化の促進効果はポリアミン添加の場合ほど顕著ではなかった。また、カリウムイオンの添加ではポリアミン添加で見られたコンパクト化の促進は確認されなかった。尚、カリウムイオン、ポリアミン、アセチルポリアミンはいずれも単独でDNAに作用し、高温環境下での二本鎖DNAの融解を防いだが、コンパクト化は認められなかった。以上の結果はポリアミンはヒストンと相互作用し、高温でのヌクレオソーム構造の維持に関わっていることを強く示唆する。

トリプトファン合成経路酵素群： トリプトファン合成経路は微生物の重要な代謝経路の一つであるが、トリプトファン合成に関する全遺伝子(*trpE*, *trpG*, *trpD*, *trpF*, *trpC*, *trpA*, *trpB*、代謝経路順)は生物によって、少しずつ異なるオペロンになっている。前年度までに我々はKOD1株由来の*trp*遺伝子の単離、塩基配列の決定、northern hybridization分析を行い、始原菌由来のトリプトファン合成酵素が転写レベルで制御されていることを明らかにしてき

た。本オペロンは7つの遺伝子から構成されるが、この中で最終的な反応を触媒するtryptophan synthaseに対応するTrpA, Bは一般的に 2 2の構造を持っており、のみあるいは 2のみでそれぞれ活性を有することから高い耐熱性とその構造との関係に関心が持たれる。そこで、今年度はtryptophan synthaseの組換え体を調製し、その酵素化学的な性質を調べることを目的とした。

それぞれTrpA単独、TrpB単独、TrpA, B complex (TS complex) の3種類の組合せで組換えタンパク質を発現させ、超音波破碎後、熱処理をして大腸菌由来のタンパク質を沈殿させた後、上清をイオン交換、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーを用いて精製した。SDS-PAGEでほぼ単一バンドになることを確認したのちに温度特性、pH特性などを検討した。その結果、TS complexの状態が最も安定しており、最適温度は90、最適pHは8.0、ゲル濾過クロマトグラフィーおよびSDS-PAGEによる分析により 2 2構造を取っていることが示唆された。一方、TrpB単独の場合は活性の反応初速度が高くなるが、耐熱性が低くなり、活性も低くなることが示唆された。また、 2構造を取っていることがゲル濾過クロマトグラフィーで確認された。TrpAの酵素活性についても検討しているところである。

(2) 新規微生物の分離と解析

進化の源流に位置すると考えられている超好熱菌は近年数多く分離、研究されているが、KOD1株を含めそのほとんどは絶対嫌気性菌である。我々は熱水環境には好気性の超好熱菌も生息していると考え、その分離を試みた。その結果、固体培地にコロニーを形成させることで好気条件下で生育する超好熱菌・VA1株の単離に成功した。

VA1株の最適生育条件は、大気条件下で温度90~95、pH7.0、NaCl濃度0.1%であった。また嫌気条件下では、超好熱菌には珍しく硫黄化合物ではなく硝酸イオンを最終電子受容体として生育することが分かった。細胞は約1 μmの桿菌であった(図6)。また*Pyrobaculum*属と*Thermoproteus*属に特有な末端がふくれる現象を確認した。VA1株よりゲノムDNAを抽出し、16S rRNA遺伝子の塩基配列を決定した。系統解析の結果、VA1株は*Pyrobaculum*属に近縁であることが分かった。現在、好気性生物に特徴的な酸化還元酵素、特にカタラーゼなどについて研究を進めている。

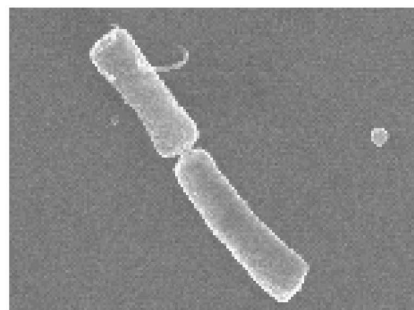


図6．新しく分離した好気性超好熱菌VA1株の電子顕微鏡写真

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

Presence of a structurally novel type ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase in the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1.

Satoshi Ezaki, Norihiro Maeda, Tsukuru Kishimoto, Haruyuki Atomi & Tadayuki Imanaka

J. Biol. Chem., 274, 5078-5082, 1999.

A unique DNase activity shares the active site with ATPase activity of RecA/Rad51 homologue (*Pk-REC*) from a hyperthermophilic archaeon.

Naeem Rashid, Masaaki Morikawa, Shigenori Kanaya, Haruyuki Atomi & Tadayuki Imanaka

FEBS Lett., 445, 111-114, 1999.

In vitro heat effect on functional and conformational changes of cyclodextrin glucanotransferase from hyperthermophilic archaea.

Tomoko Yamamoto, Kentaro Shiraki, Shinsuke Fujiwara, Masahiro Takagi, Kiichi Fukui & Tadayuki Imanaka

Biochem. Biophys. Res. Commun., 265, 57-61, 1999.

Identification of the gene encoding esterase, a homolog of hormone-sensitive lipase, from an oil-degrading bacterium, strain HD-1.

Satoru Mizuguchi, Kei Amada, Mitsuru Haruki, Tadayuki Imanaka, Masaaki Morikawa & Shigenori Kanaya

J. Biochem., 126, 731-737, 1999.

Pk-cdcA, encodes a CDC48/VCP homologue in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1: transcriptional and enzymatic characterization.

S. J. Jeon, Shinsuke Fujiwara, Masahiro Takagi & Tadayuki Imanaka

Mol. Gen. Genet., 262, 559-567, 1999.

Hyperthermostable protein structure maintained by intra and inter-helix ion-pairs in archaeal O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase.

Hiroshi Hashimoto, Tsuyoshi Inoue, Motomu Nishioka, Shinsuke Fujiwara, Masahiro Takagi, Tadayuki Imanaka & Yasushi Kai

J. Mol. Biol., 292, 707-716, 1999.

Characterization and application to hot start PCR of neutralizing monoclonal antibodies against KOD DNA polymerase.

Hiroshi Mizuguchi, Miki Nakatsuji, Shinsuke Fujiwara, Masahiro Takagi & Tadayuki Imanaka

J. Biochem., 126, 762-768, 1999.

Gene analysis and enzymatic properties of thermostable α -glycosidase from *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1.

Satoshi Ezaki, Kohei Miyaoku, Ken-ichi Nishi, Takeshi Tanaka, Shinsuke Fujiwara, Masahiro Takagi, Haruyuki Atomi & Tadayuki Imanaka

J. Biosci. Bioeng., 88, 130-135, 1999.

Characterization of petroleum-degrading bacteria from oil-contaminated sites in Vietnam.

Nguyen Q. Huy, Sha Jin, Kei Amada, Mitsuru Haruki, Nguyen B. Huu, Dinh T. Hang, Dang T. C. Ha, Tadayuki Imanaka, Masaaki Morikawa & Shigenori Kanaya

J. Biosci. Bioeng., 88, 100-102, 1999.

Gene cloning and characterization of aldehyde dehydrogenase from a petroleum-degrading bacterium strain HD-1.

Naoko Okibe, Kei Amada, Shin-ichi Hirano, Mitsuru Haruki, Tadayuki Imanaka, Masaaki Morikawa & Shigenori Kanaya

J. Biosci. Bioeng., 88, 7-11, 1999.

Sequence and transcriptional studies of five clustered flagellin genes from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1.

Keisuke Nagahisa, Satoshi Ezaki, Shinsuke Fujiwara, Tadayuki Imanaka & Masahiro Takagi

FEMS Microbiol. Lett., 178, 183-190, 1999.

Isolation and characterization of psychrotrophs from subterranean environments.

Naeem Rashid, Hiroshi Kikuchi, Satoshi Ezaki, Haruyuki Atomi & Tadayuki Imanaka

J. Biosci. Bioeng., 87, 746-751, 1999.

Crystallographic studies on family B DNA polymerase from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus kodakaraensis* strain KOD1.

Hiroshi Hashimoto, Tomoya Matsumoto, Motomu Nishioka, Toru Yuasa, Shoko Takeuchi, Tsuyoshi Inoue, Shinsuke Fujiwara, Masahiro Takagi, Tadayuki Imanaka & Y. Kai

J. Biochem., 125, 983-986, 1999.

The concept of the α -amylase family; structural similarity and common catalytic mechanism.

Takashi Kuriki & Tadayuki Imanaka

J. Biosci. Bioeng., 87, 557-565, 1999.

Analysis of DNA compaction profile and intracellular contents of archaeal histones from *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1.

Hiroki Higashibata, Shinsuke Fujiwara, Masahiro Takagi & Tadayuki Imanaka
Biochem. Biophys. Res. Commun., 258, 416-424, 1999.

Purification and characterization of an extremely thermostable cyclomalto-dextrin glucanotransferase from a newly isolated hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus* sp.
Yoshihisa Tachibana, Akiko Kuramura, Naoki Shirasaka, Yuji Suzuki, Tomoko Yamamoto, Shinsuke Fujiwara, Masahiro Takagi & Tadayuki Imanaka
Appl. Environ. Microbiol., 65, 1991-1997, 1999.

Isolation of TBP-interacting protein (TIP) from a hyperthermophilic archaeon that inhibits the binding of TBP to TATA-DNA.

Tomoki Matsuda, Masaaki Morikawa, Mitsuru Haruki, Hiroki Higashibata, Tadayuki Imanaka & Shigenori Kanaya
FEBS Lett., 457, 38-42, 1999.

Isolation and characterization of a second subunit of molecular chaperonin from *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1: Analysis of ATPase deficient mutant.
Michi Izumi, Shinsuke Fujiwara, Masahiro Takagi, Shigenori Kanaya & Tadayuki Imanaka
Appl. Environ. Microbiol., 65, 1801-1805, 1999.

The expression of tryptophan biosynthesis gene cluster trpCDEGFBA from *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1 is regulated at the transcriptional level as a single mRNA.
Xiaofeng Tang, Satoshi Ezaki, Shinsuke Fujiwara, Masahiro Takagi, Haruyuki Atomi & Tadayuki Imanaka
Mol. Gen. Genet., 262, 815-821, 1999.

Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1 is composed solely of large subunits and forms a pentagonal structure.
Norihiro Maeda, Ken Kitano, Toshiaki Fukui, Satoshi Ezaki, Haruyuki Atomi, Kunio Miki & Tadayuki Imanaka
J. Mol. Biol., 293, 57-66, 1999.

A unique chitinase with dual active sites and triple substrate binding sites from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1.
Takeshi Tanaka, Shinsuke Fujiwara, Shingo Nishikori, Toshiaki Fukui, Masahiro Takagi & Tadayuki Imanaka
Appl. Environ. Microbiol., 65, 5338-5344, 1999.