

深度地下極限環境微生物の探索と利用

研究代表者 今中忠行 京都大学大学院工学研究科・教授

研究目的

本研究では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に加えて、遺伝子資源の確保、工業的利用や環境改善へ貢献できることを期待している。

研究成果

1) 新規極限環境微生物の分離と同定

- ・極低温でも生育する SN16A 株、KB700A 株

我々は国内の地下土壌サンプルから 0℃以下の低温でも生育できる新規微生物の分離を試みた。比較的浅い地下環境から分離した SN16A 株は-5℃から 37℃の温度範囲で生育し、新属新種の微生物である可能性が示唆された。また、KB700A 株（右図）は地下 700m の水サンプルから分離され、-10℃という生物にとって極限的な低温でも増殖することを見いだした。



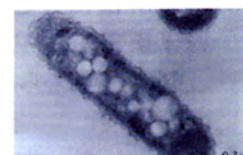
KB700A 株

- ・海底油田より分離した嫌氣的に長鎖アルコールを資化する M4 株

マレーシア沖海底油田（海拔-5000 m）より嫌気条件下で長鎖アルコール・アルデヒド類を高効率で分解・資化する M4 株の分離に成功した。嫌気条件下では M4 株は硝酸イオンを最終電子受容体とし、窒素を発生する脱窒菌であることが判った。M4 株には多数のアルコール分解系酵素が存在することが判明し、現在本菌の嫌氣的長鎖アルコール分解系の解明を目指している。

- ・石油分解合成菌 HD-1 株

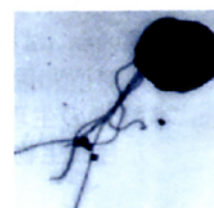
我々は静岡県相良油田より様々な直鎖状炭化水素や芳香族化合物を効率よく分解する細菌 HD-1 株を分離した。また、水素をエネルギー源、二酸化炭素を炭素源として培養した場合に HD-1 株の菌体内に炭化水素の蓄積を認めた。このような特性を有する微生物はいままでに報告例はなく、HD-1 株内に様々な新規代謝系が存在すると思われる。遺伝子解析により HD-1 株はα-proteobacteria に属する親族新種の微生物であることが判明した。



HD-1 株

- ・超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 株

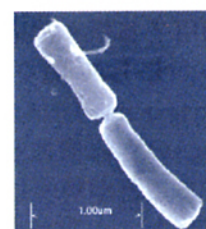
我々は鹿児島県小宝島の硫気孔より超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 株を分離した。本菌は 65℃~100℃という高温で生育する絶対嫌気性菌であり、硫黄呼吸や発酵を行って、アミノ酸や多糖類を分解・資化する。また、16S rRNA の比較により、KOD1 株は進化系統樹の根の近いところに位置する極めて単純な生命体であることが示唆された。



KOD1 株

- ・好気性超好熱始原菌 *Pyrobaculum calidifontis* VA1 株

KOD1 株を含め、超好熱菌のほとんどは絶対嫌気性菌であるが、我々はフィリピンの温泉より好気条件下で生育する超好熱菌 VA1 株を分離した。VA1 株は約 1μm の桿菌であり、大気条件下で温度 90~95℃、pH7.0 で最も良好な生育を示した。また嫌気条件下では、超好熱菌には珍しく硫黄呼吸ではなく硝酸呼吸を行っていることが判った。系統解析の結果、VA1 株は *Pyrobaculum* 属に近縁でありながら、既存の菌種とは異なることが判明し、

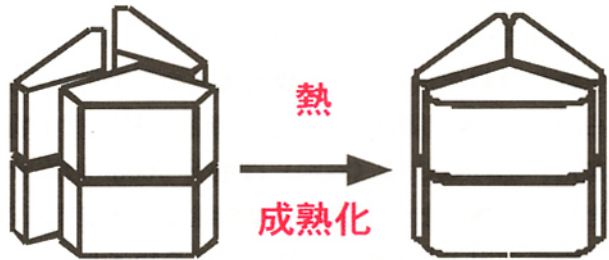


VA1 株

ラテン語の「熱い」=「calidus」および「泉」=「fontis」をもとに、本菌を *Pyrobaculum calidifontis* VA1 と命名した。

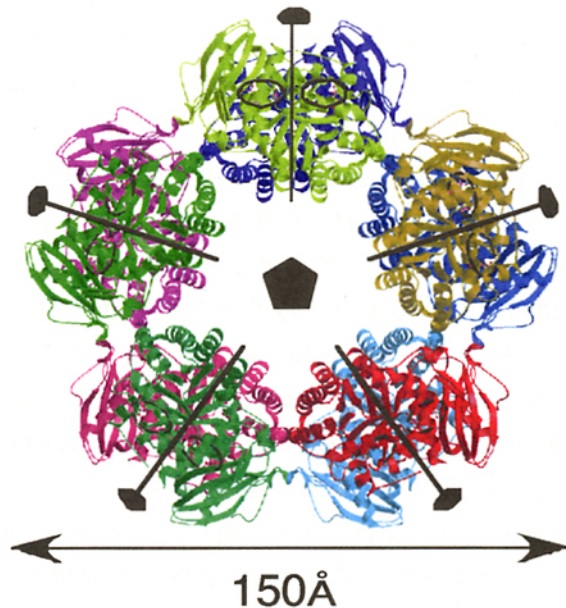
2) 耐熱性酵素の成熟化には高温環境が必要

我々は KOD1 株の glutamate dehydrogenase (GDH) の研究を通じて、超好熱菌由来タンパク質に普遍的な特性を発見した。すなわち、常温菌由来のタンパク質は一般に熱により変性するのに対し、超好熱菌由来の組換えタンパク質は熱により成熟していくことを明らかにした。KOD1 株内の高温環境で合成された GDH は 6 量体構造を有し、高い比活性を示す。一方、GDH 遺伝子を大腸菌を宿主として発現させた場合では、天然型の GDH と比べて酵素活性が低く、構造の異なる単量体タンパク質が得られた。そこで 70℃、20min の熱処理を施すと組換え型 GDH は比活性、立体構造ともに天然型の GDH に近づくことが明らかとなった。また、一度熱処理を行うことにより、本酵素は低温域でも天然型 GDH と類似した挙動をした。このような特徴は GDH のみならず、我々が解析した超好熱菌由来酵素の全てについて認められた。以上のことから、耐熱性タンパク質の成熟化には熱が重要であり、それは熱による酵素タンパク質の不可逆な構造変換に起因することが判明した (右図)。



3) 新しい構造や機能特性を有する酵素の発見

Rubiscoは全ての植物・藻類・藍藻に存在し、二酸化炭素を有機物に固定する重要な役割を担っている。Rubiscoは地球上で最も多量に存在する酵素であり、本酵素の改良は地球温暖化や食糧問題の解決に大きく貢献すると期待されている。いままで原始生命体に近い始原菌はRubiscoを有しないと考えられてきたが、我々はKOD1株内に高い炭酸固定能を有するRubiscoが存在することを発見した。本酵素 (*Tk-Rubisco*) は従来のRubiscoと比較して20倍も高い活性を有し、二酸化炭素に対する特異性も極めて高いことが判明した。*Tk-Rubisco*は構造的にも新規であり、前例のない五角形型10量体構造をとっていた (右図)。現在は本酵素の生理的役割の解明とともに、植物などの光合成生物への導入を進めている。



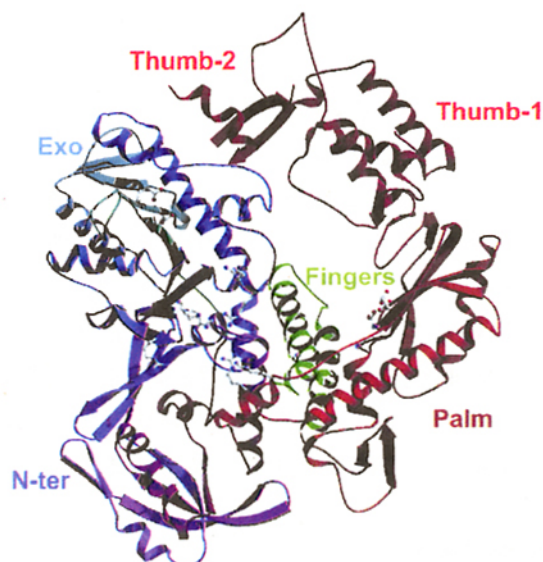
4) 構造解析に基づいた超好熱菌由来タンパク質の耐熱性機構の解明

超好熱菌由来タンパク質が示す高度な耐熱性は、タンパク質科学の基礎分野のみならず、酵素を利用する様々な応用分野から注目を集めている。我々は多数のKOD1株由来酵素の立体構造を明らかにしており、それらの耐熱性機構を解明することができた。代表的な例として α -methylguanine-DNA methyltransferase (*Tk-MGMT*) が挙げられる。*Tk-MGMT* とその大腸菌由来酵素 (*AdaC*) の立体構造を比較すると、*Tk-MGMT* には α -helix を安定化する helix 内イオン結合が多数存在することが判明した。また、タンパク質全体の構造を安定化する helix 間イオン結合も多く存在していた。大腸菌由来 *AdaC* にはこのようなイオン結合は少なく、超好熱菌由来酵素は多数のイオン結合やイオン結合ネットワークにより高度な耐熱性を発揮していることが判った。これは上

述のGDHにおいても同様であり、生化学的にも証明することができた。すなわち、GDH内に存在するイオン結合ネットワークを壊すような部位特異的変異を導入した場合には、変異酵素の熱安定性が大きく低下した。逆にイオン結合を増加させた変異酵素の耐熱性は上昇した。

5) 有用酵素の利用

Polymerase Chain Reaction (PCR 法) は遺伝子操作技術にもはや不可欠な技術の 1 つとなっており、その応用は医療、環境、食糧など様々な分野に及んでいる。現在、PCR 法に求められている改良点は増幅時間の短縮、誤増幅の防止、長い DNA 断片の増幅である。特に臨床検査、食品検査では速く、正確に DNA を合成する DNA polymerase が要求されている。我々は KOD1 株の DNA polymerase (KOD DNA polymerase) の機能解析を行った結果、本酵素は従来酵素と比較して DNA の合成速度が速く、長い DNA を合成する能力も高いことを見いだした。実際、KOD1 株の DNA polymerase を用いると、従来の Taq 酵素で 2 時間かかっていた PCR の反応時間を約 25 分に短縮できた。また、KOD DNA polymerase の 3'→5' exonuclease 活性を欠失させた改変型酵素と野生型酵素とを最適な割合で混合することにより、より優れた反応効率・伸長性を得ることができた。我々はさらに KOD DNA polymerase の抗体を用いることにより、PCR 反応の初期に見られる誤増幅を抑え、極めて正確で効率の良い DNA 増幅系を確立することができた。本システムは東洋紡績社から「KOD-Plus-」システムとして上梓中であり、また Life Technologies/GIBCO BRL 社より「Platinum™ Pfx DNA polymerase」として欧米各国で販売されている。最近我々はさらに KOD DNA polymerase の結晶化・X 線構造解析を行い、その立体構造を決定した。詳細な立体構造に基づいて、本酵素の伸長反応の速さ、複製能力の正確さなどがどのような構造に起因するかを解明することができた (右図)。



我々は DNA polymerase 以外にも多数の有用耐熱性酵素を同定解析している。DNA ligase は 2 つの DNA 断片の末端を結合させる反応を触媒し、本酵素も遺伝子組換え技術の中で不可欠な酵素である。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が、KOD1 株の DNA ligase (*Tk-Lig*) は 30℃から 100℃において高い DNA ligase 活性を示した。さらに *Tk-Lig* の nick 部位における基質 (base-pairing) 特異性は興味深く、3'末端に対しては厳密な塩基対形成が必要であったが、5'末端に対しては基質特異性が甘いことが判明した。このような特徴をもつ DNA ligase は他に報告例はなく、1 塩基置換 (SNPs) 検出への本酵素の応用が期待される。糖質関連酵素としては、デンプンなどに見られる $\alpha(1-4)$ 結合を切断する α -amylase や環化反応を触媒して cyclodextrin を合成する cyclodextrin glucanotransferase、転移反応を触媒する 4- α -glucanotransferase について生化学的諸性質を明らかにしている。セルロースやキチンに見られる $\beta(1-4)$ 結合を切断する β -glycosidase や chitinase についても詳細な解析を行った。特に KOD1 株の chitinase には同一ポリペプチド鎖上に 2 つの chitinase 活性ドメインが存在し、1 つが endochitinase 活性、もう片方が exochitinase 活性を有した。これら 2 つの触媒ドメインの相乗作用により本酵素は極めて高いキチン分解活性を示す。

