

深度地下極限環境微生物の探索と利用

今中忠行 京都大学大学院工学研究科・教授

研究概要

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の解明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、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。

主な研究成果

①新規微生物の分離

低温菌 SN16A 株と KB700A 株：我々は、様々な国内の地下土壌サンプルを取得し、それらから 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℃の温度範囲で生育がみられた。本菌はグラム陽性菌でありその 16S rRNA 配列の解析から新属新種の微生物である可能性が示唆された。また、KB700A 株は地下 700m の水サンプルから分離され、-10℃という生物的には極限的な低温でも増殖することを見いだした。本菌はさらに、リパーゼ、プロテアーゼなどを生産しており、低温でも活性を有する加水分解酵素として洗剤などへの利用も期待できる。

好気性超好熱始原菌：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されているが、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、好気条件下で良好に生育する超好熱始原菌 VA1 株の単離に成功した。VA1 株は約 1 μm の桿菌であり、大気条件下で温度 90~95℃、pH7.0 で最も増殖した。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判った。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。

②興味深い代謝系・酵素

Lon protease：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 subunit 中に ATPase 活性ドメインと protease 活性ドメインを合わせ持つ。超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 株のゲノム解析から Lon protease と相同性のある遺伝子を取得し、その発現産物 (Tk-Lon) の生化学的解析を行った。その結果、Tk-Lon は ATP 非存在下では unfold されたタンパク質のみを分解し、正しく folding されたタンパク質に対しては活性を示さなかった。一方、ATP 存在下では正しく folding されたタンパク質をも分解することが判明したので、Tk-Lon は ATP のエネルギーを用いてタンパク質の高次構造を崩しながら

ら protease 活性ドメインによるタンパク質分解を行っていることが示唆される。

Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) :

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、植物、藻類などで炭酸固定（カルビン回路）の鍵酵素として機能する。我々は、超好熱菌としては初めて、*T. kodakaraensis* KOD1 株にも Rubisco (*Tk*-Rubisco) が存在することを発見し、本酵素は従来の Rubisco と比べて高い活性を有し、極めて carboxylase 特異的であることを見いだした。さらに構造解析を進めた結果、*Tk*-Rubisco が新規な十量体（五角形）構造を有することが判明した。本酵素の結晶化にも成功し、その立体構造を決定した。

その他の興味深い酵素、生体分子：新規構造を有する炭酸固定酵素 biotin-dependent carboxylase、基質特異性の広い aspartyl-tRNA synthetase、DNA の熱変性を防ぐ histone、polyamine 類など。

③有用バイオマテリアル

耐熱性 DNA polymerase:PCR (Polymerase Chain Reaction) 法は遺伝子操作技術の常識的な手法になりつつある。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 断片の合成である。KOD1 株由来の酵素は、従来の耐熱性 DNA polymerase と比べて正確に DNA を増幅し、その合成速度が速く、長い DNA を合成する性質を有しており、最高性能の酵素と言える。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、KOD1 DNA ポリメラーゼに特異的な抗体を用いることにより、さらに正確で効率の良い DNA 増幅系を確立することができた（東洋紡績から KOD プラスシステム、Life Technologies から PLATINUM Pfx DNA polymerase として販売中）。

耐熱性 DNA ligase : 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。KOD1 株の DNA ligase (*Tk*-Lig) は極めて安定な酵素であり、30℃から 100℃において DNA ligase 活性を示す。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。

その他の有用酵素：Chitin 分解に利用できる耐熱性 chitinase、cellulose 分解に利用できる基質特異性の広い高活性β-glycosidase、糖質化学に利用できる耐熱性α-amylase、cyclodextrin glucanotransferase (CGTase)、水素 (clean energy) 生産に利用できる耐熱性 hydrogenase、タンパク質の可溶化、安定化に役立つ molecular chaperonin など。