

「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

新型Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase( Rubisco )の立体構造解析: Rubiscoは、Ribulose 1,5-bisphosphateにCO<sub>2</sub>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。これまでの研究を通じて、我々は*T. kodakaraensis* KOD 1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。平成12年度では、本酵素の結晶構造解析を終了し、280 kDaの分解能で*Tk*-Rubiscoの立体構造を明らかにした(図1)。本酵素のmonomer構造、dimer構造はType I、Type II酵素と類似していたが(図2)、ホロ酵素のsubunit assemblyは全く異なっていた。Dimer-dimer間(L2-L2間)の相互作用に参与するアミノ酸残基は従来のRubiscoと異なっており、イオン結合が多数存在した(図3)。また、精製した*Tk*-Rubiscoに対し温度を変化させて、ゲルろ過、Circular Dichroism( CD )、Differential Scanning Calorimetry( DSC )解析を行った。ゲルろ過では*Tk*-Rubiscoは200 - 990 kDaにおいて同一の分子量を示し、CDの変化も観察されなかった。DSC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、今回の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。

Lon protease : Lon proteaseは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。活性中心はSer-Lys残基によるcatalytic dyadから形成されてい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が得られたので、始原菌におけるLon protease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protease活性部位が存在していることが明らかになった。Protease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。

本遺伝子が活性を有する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、精製することができた。*Tk*-Lonの酵素学的性質を調べた結果、意外なことに本酵素はATP非存在下でもpeptidase活性を有することが判明した。詳細な解析を行ったところ、*Tk*-LonはATP非存在下ではpeptidase活性を有するが、正しくfoldingされたタンパク質を分解することはできず、ATP添加時にはpeptidase活性は低下するものの、正しくfoldingされたタンパク質をunfoldingさせ、分解するprotease活性を示すようになることが判明した(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。

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。

*Tk-Lig*は2つの興味深い特性を有した。20nM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5）。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200nM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5）。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。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（図6）。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。

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。本年度ではトリプトファン合成に関与する以下の3種の酵素について解析を行った。

まず、第1反応を触媒する *Tk*-Anthranilate synthase( *Tk*-AS )の酵素化学的性質を解析した。 *Tk*-*trpE* と *Tk*-*trpG* をそれぞれ大腸菌内で発現し、組換え *Tk*-TrpE (  $\alpha$ subunit ) と *Tk*-TrpG (  $\beta$ subunit ) を含む大腸菌のcell-free extractを混合した後熱処理することにより、 *Tk*-AS complexを得た。 *Tk*-AS complexはheterodimer (  $\alpha\beta$  ) で、 ammoniaおよびglutamineの双方をNH<sub>2</sub>供与体とするAS活性を示した。 *Tk*-ASは高い耐熱性を有しており、反応最適温度は85℃、最適pHは10であった。 *Tk*-AS活性にはMg<sup>2+</sup>が必要であった。 *Tk*-TrpEは *Salmonella typhimurium* 由来のTrpEとは47.6%の類似性を示したが、 *S. typhimurium* および *Saccharomyces cerevisiae* での部位特異的変異実験により同定されたトリプトファンのフィードバック阻害に関わるアミノ酸残基は *Tk*-TrpEには保存されていなかった。それにもかかわらず、 *Tk*-ASの活性はトリプトファンにより顕著に阻害されることが判明した。 Ammoniaおよびglutamine依存的活性に対するトリプトファンのK<sub>i</sub>値はそれぞれ5.25  $\mu$ Mと74  $\mu$ Mであった。また、トリプトファンによる阻害は反応の基質chorismateに対して競争的であった。この結果から、 *Tk*-AS complexのトリプトファンによるフィードバック阻害に関わるアミノ酸残基は今まで研究されたASと異なることが示唆された。

また、第2反応を触媒するanthranilate phosphoribosyltransferase( *Tk*-PRT )の酵素化学的性質を解析した。これは始原菌由来のPRTとしては初めての報告であった。 *Tk*-*trpD* を大腸菌内で発現し、二量体である組換え *Tk*-PRTを精製した。今まで報告されてきたPRTのほとんどがTrpGとの融合タンパク質として存在するのに対して、 *Tk*-TrpDは単独に存在するmonofunctionalな酵素であった。金属イオン要求性は今まで報告されてきたMg<sup>2+</sup>依存型PRTと異なっており、Zn<sup>2+</sup>存在下で最大活性を示した。Zn<sup>2+</sup>依存型PRT活性はCa<sup>2+</sup>およびMg<sup>2+</sup>依存型活性の1.7および2.5倍であった。Zn<sup>2+</sup>とMg<sup>2+</sup>の濃度がそれぞれ100  $\mu$ Mおよび200  $\mu$ Mで最大活性を示したが、これら以上の濃度では酵素活性の顕著な減少が観察された。 *Tk*-TrpDは *T. kodakaraensis* KOD1由来の他の酵素と比べて耐熱性が低いことが観察されたが、Zn<sup>2+</sup>とMg<sup>2+</sup>の添加により酵素の熱安定性が向上した。基質であるanthranilateおよび5-phosphoribosyl-1-pyrophosphateに関して、Zn<sup>2+</sup>およびMg<sup>2+</sup>依存型活性のそれぞれのK<sub>m</sub>値を決定した。また、 *Tk*-TrpD活性がanthranilateによる基質阻害を受けることが明らかとなった。

さらに、トリプトファン生合成経路における最後の反応を触媒するTSに関する研究を進めた。 *Tk*-*trpA* と *Tk*-*trpB* をそれぞれ大腸菌内で発現し、組換え *Tk*-TrpA (  $\alpha$ subunit ) および *Tk*-TrpB (  $\beta$ subunit ) を含む大腸菌のcell-free



extractを混合し、熱処理によりTS complexを形成させた。 $\alpha$ 、 $\beta$ subunitおよびTS complexの三種類の酵素を精製し、それぞれの酵素化学的性質を解析した。ゲル濾過カラムクロマトグラフィーの結果から、 $\alpha$ subunitは単量体 ( $\alpha$ )、 $\beta$ subunitは二量体 ( $\beta_2$ )、TS complexはヘテロ四量体 ( $\alpha_2\beta_2$ ) であることが明らかになった。温度特性、pH特性などを検討した結果、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であった。一方、 $\beta_2$ は低温域では活性は低く、80以上で活性の反応初速度が高くなるが、耐熱性が低くなることが観察された。 $\alpha$ 単独の場合は熱安定性、酵素活性双方について低いことが判明した。以上の結果およびCDによる構造変化の解析より温度と各subunitの構造・活性の相関関係を表すモデルを提唱した(図7)。

以上の研究成果より、超好熱始原菌内でのトリプトファン合成がどのような機構で制御されているかを解明することができた。転写レベルではトリプトファンの蓄積によりCDEGFBA オペロンの転写が抑制されることが判明した。また、翻訳後調節としては、トリプトファンによるanthranilate synthaseに対するフィードバック阻害、anthranilateによるanthranilate phosphoribosyltransferaseに対する基質阻害が起こることが判明し、熱に対して不安定な代謝中間化合物がKOD1株内で蓄積しない機構の存在が明らかとなった(図8)。

## (2) 新規好気性超好熱始原菌*Pyrobaculum calidifontis* VA 1株の分離と解析

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%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 $\mu$ mの桿菌であった。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*属に近縁でありながら、既存の菌種とは異なることが判明した。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。

Esteraseは、エステルを加水分解する酵素の総称であり、作用する基質により、cholinesterase、carboxylesterase、phosphoesteraseなどに分類される。工

学的な観点から、esteraseはエステル合成、分解、交換反応、ラセミ体エステルの光学分割などの優れた触媒となることが実証され、その重要性は急速に高まってきている。プレートアッセイ及び蛍光基質を用いた活性測定の結果、VA1株の粗酵素液中にesterase活性を確認したので、その遺伝子単離、構造解析を行った。一般にesteraseにおいて、活性中心であると予想されるserineを含んだG-X-S-X-G motif、及びserineとともにcatalytic triadを形成するaspartate、histidineが保存されていた。大腸菌内での本遺伝子の発現及び組換え型酵素の精製を行い、現在本酵素の様々な基質に対する基質特異性の決定を行っている。

VA-1株が好気条件下でも良好に生育することから、酸素分子( $O_2$ )が関与する酵素の同定・解析を進めた。その結果、VA-1株内に過酸化水素( $H_2O_2$ )を分解する耐熱性catalaseが存在することが判明した。硫酸分画、各種chromatographyより本酵素を精製し、酵素学的解析および遺伝子の単離・構造解析を行った。特徴的なのはVA-1株のcatalaseは通常のcatalaseが有するheme補因子をもたず、Mnを含んでいたことである。

### 3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

"A DNA ligase from a hyperthermophilic archaeon with unique cofactor specificity", M. Nakatani, S. Ezaki, H. Atomi and T. Imanaka, J Bacteriol., 182, 6424-6433 (2000)

"Anti-phytochelatin monoclonal antibody", H. Satofuka, S. Amano, T. Fukui, H. Atomi, M. Takagi and T. Imanaka, Biotechnol. Lett., 22, 1423-1428 (2000)

"Biochemical analysis of a thermostable tryptophan synthase from a hyperthermophilic archaeon", X.-F. Tang, S. Ezaki, H. Atomi and T. Imanaka, Eur. J. Biochem., 267, 6369-6377 (2000)

"Crystallographic study of intein homing endonuclease II encoded in the archaeal DNA polymerase gene", H. Hashimoto, H. Takahashi, M. Nishioka, S. Fujiwara, M. Takagi, T. Imanaka, T. Inoue and Yasushi Kai, Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr., 56, 1185-1186 (2000)

"Alteration of product specificity of cyclodextrin glucanotransferase from *Thermococcus* sp. B1001 by site directed mutagenesis", T. Yamamoto, S. Fujiwara, Y. Tachibana, M. Takagi, K. Fukui and T. Imanaka, J. Biosci. Bioeng. 89, 206-209 (2000)

"Acceptor specificity of  $\alpha$ -glucanotransferase from *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1, and synthesis of cycloamylose", Y. Tachibana, T. Takaha, S. Fujiwara, M. Takagi and T. Imanaka, J. Biosci. Bioeng. 90, 406-409 (2000)

"Characterization of FtsZ homolog from hyperthermophilic archaeon

*Pyrococcus kodakaraensis* KOD1", K. Nagahisa, T. Nakamura, S. Fujiwara, T. Imanaka, and M. Takagi, J. Biosci. Bioeng. 89, 181-187( 2000 )

"Effect of polyamines on histone-induced DNA compaction of hyperthermophilic archaea", H. Higashibata, S. Fujiwara, S. Ezaki, M. Takagi, K. Fukui, and T. Imanaka, J. Biosci. Bioeng. 89, 103-106( 2000 )

"Screening of an oligopeptide antagonist for interleukin 6 from a random phage library", H. Mizuguchi, T. Kubomi, R. Nomura, K. Yasukawa, T. Imanaka and M. Takagi, Biotechnol. Lett., 22, 1015-1020( 2000 )

"A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants", M. Morikawa, Y. Hirata and T. Imanaka, Biochim. Biophys. Acta, 1488, 211-218 ( 2000 )

"Overproduction in Escherichia coli, purification and characterization of a family I.3 lipase from *Pseudomonas* sp. MIS38", K. Amada, M. Haruki, T. Imanaka, M. Morikawa and S. Kanaya, Biochim. Biophys. Acta. 1478, 201-210( 2000 )

"Crystallization and preliminary X-ray study of Pk-REC from a hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1", K. Harata, N. Ishii, N. Rashid, M. Morikawa and T. Imanaka, Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr., 56, 648-649( 2000 )

"ATP-citrate lyase from the green sulfur bacterium *Chlorobium limicola* is a heteromeric enzyme composed of two distinct gene products", T. Kanao, T. Fukui, H. Atomi and T. Imanaka, Eur. J. Biochem., 268, 1670-1678( 2001 )

"Anthranilate synthase without an LLES motif from a hyperthermophilic archaeon is inhibited by tryptophan", X.-F. Tang, S. Ezaki, H. Atomi and T. Imanaka, Biochem. Biophys. Res. Commun., 281, 858-865( 2001 )

"Chitinase from *Thermococcus kodakaraensis* KOD1", T. Imanaka, T. Fukui and S. Fujiwara, Methods Enzymol., 330, 319-329( 2001 )

"Rubisco from the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis* KOD1", H. Atomi, S. Ezaki and T. Imanaka, Methods Enzymol., 331, 353-365 ( 2001 )

"Thiol protease from *Thermococcus kodakaraensis* KOD 1", M. Morikawa and T. Imanaka, Methods Enzymol., 330, 424-33( 2001 )

"Crystal structure of DNA polymerase from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1", H. Hashimoto, M. Nishioka, S. Fujiwara, M. Takagi, T. Imanaka, T. Inoue, Y. Kai. J. Mol. Biol., 306, 469-77( 2001 )

"Two kinds of archaeal chaperonin with different teperature dependency from a

hyperthermophile", M. Izumi, S. Fujiwara, M. Takagi, K. Fukui and T. Imanaka, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280, 581-587 ( 2001 )

"Utilization of immobilized archaeal chaperonin for enzyme stabilization", M. Izumi, S. Fujiwara, M. Takagi, K. Fukui and T. Imanaka, *J. Biosci. Bioeng.*, 91, 316-318 ( 2001 )

"Unique nucleotid structure during cell division of *Thermococcus kodakaraensis* KOD1", S.-J. Jeon, S. Fujiwara, M. Takagi, K. Fukui and T. Imanaka, *J. Biosci. Bioeng.*, 91, 40-43 ( 2001 )

"Isolation and characterization of long-chain-alkane degrading *Bacillus thermoleovorans* from deep subterranean petroleum reservoirs", T. Kato, M. Haruki, T. Imanaka, M. Morikawa and S. Kanaya, *J. Biosci. Bioeng.*, 91, 64-70 ( 2001 )

"Gene cloning of an alcohol dehydrogenase from thermophilic alkane-degrading *Bacillus thermoleovorans* B23", T. Kato, A. Miyanaga, M. Haruki, T. Imanaka, M. Morikawa and S. Kanaya, *J. Biosci. Bioeng.*, 91, 100-102 ( 2001 )