

「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

- ① Chitinase: キチンは N-アセチル-D-グルコサミン(GlcNAc)が β -1,4 結合により重合した結晶性多糖であり、地球上で第二の生産量を占めるバイオマス資源である。Chitinase はこのキチンの β -1,4 結合を加水分解する酵素であり、特に耐熱性 chitinase はキチンを有効利用する上で重要な役割を果たすと考えられる。我々はこれまでに、超好熱始原菌 *T. kodakaraensis* KOD1 株由来の chitinase (*Tk-ChiA*) が 1215 アミノ酸からなる推定分子量 134kDa の巨大タンパクであり、1 分子内に 2 つの chitinase 相同領域と3つのキチン結合ドメイン(Chitin Binding Domain: CBD)領域が存在することを明らかにしてきた。そこで平成 13 年度では、2つの触媒ドメインについてその諸性質を検討した。基質結合ドメインの影響を無くすため N 末端側と C 末端側の触媒ドメインのみからなる欠失変異体 ChiA Δ 5 と ChiA Δ 4 を大腸菌で発現させ、熱処理および各種クロマトグラフィーにより精製した。いずれの変異体酵素も耐熱性 chitinase 活性を示したことから、2つの chitinase 相同領域はそれぞれ単独で機能することを見いだした。特に ChiA Δ 4 は 100° C、3 時間の熱処理後にも 70%の残存活性を示し、極めて高い耐熱性を有していた。キチンを基質とした分解実験ではこれら 2 つの変異体において相乗効果が認められたことから、2 つの触媒ドメインは異なる切断様式を示すことが考えられた。薄層クロマトグラフィーを用いて

キチンオリゴ糖やその *p*-nitrophenol 誘導体の分解物を同定したところ、ChiA Δ5 は主に非還元末端から2 つ目の結合を分解し、ChiA Δ4 は非還元末端から1 つ目以外の結合をランダムに分解することを見いだした。ChiA Δ5、ChiA Δ4 は共に糖転移活性も有していた。また反応初期におけるコロイダルキチン分解物の高速液体クロマトグラフィーにより、ChiA Δ5 は主に 2 糖を、ChiA Δ4 は様々な重合度のオリゴ糖を遊離させることが示された(図 1)。これらの結果から、ChiA Δ5 は exochitinase であり ChiA Δ4 は endochitinase であることが明らかとなった。KOD1 由来 chitinase は単一ポリペプチド鎖上に異なる切断様式の触媒ドメインを有し、これらの相乗作用によってキチンの分解を効率良く行っていることが推測された(図 2)。

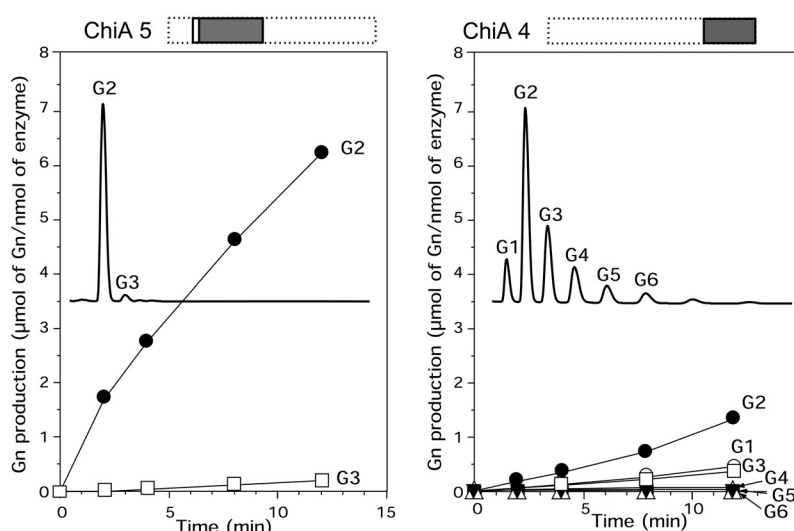


図1. ChiA 5、ChiA 4 によるコロイダルキチン分解反応初期における分解物の HPLC 解析

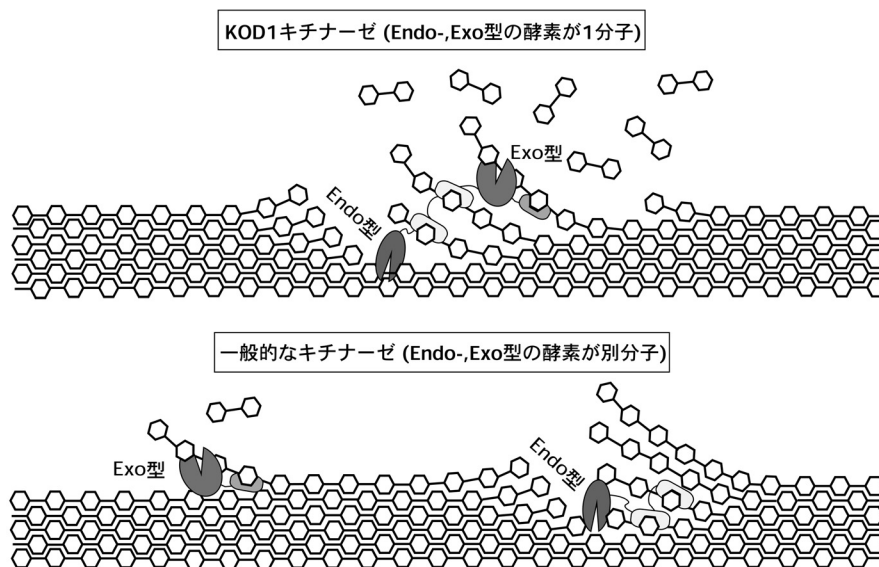


図2. 結晶性キチンの分解モデル

② 新型 Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) の五角形構造と耐熱性の関係: Rubisco は、Ribulose 1,5-bisphosphate に CO_2 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* 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。また、本酵素の結晶構造解析を終了し、 2.8\AA の分解能で *Tk*-Rubisco の立体構造を明らかにした(図3)。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、

ホロ酵素の subunit assembly は全く異なっていた。Dimer-dimer 間(L2-L2 間)の相互作用に関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。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) 解析を行ったところ、*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。平成 13 年度には我々は *Tk*-Rubisco の五角形構造の意義について検討を加えた。一般的に超好熱菌の耐熱性酵素は常温菌由来酵素と比べて内部に多くの疎水性相互作用、分子表面に多くのイオン結合(ネットワーク)が存在すると考えられている。しかし、subunit assembly の様式が異なるケースはほとんど報告例がない。*Tk*-Rubisco においても、dimer の耐熱性が充分であれば Type II Rubisco のような L_2 構造を形成してもいいはずである。そこで我々は *Tk*-Rubisco の dimer-dimer interface のイオン結合に関与すると示唆された 3 残基(Glu63, Arg66, Asp69)を部位特異的に Ser に置換し、E63S、R66S、D69S および E63S/R66S/D69S 変異酵素を作製した(図4)。予想通り、E63S/R66S/D69S 変異酵素は室温でも五角形構造を形成せず、 L_2 dimer として得られた。E63S、R66S も 80°C 付近では五角形構造が崩れ、 L_2 dimer となった。D69S は 100°C 付近まで(L_2)₅ 構造を維持した。これらの変異酵素の熱安定性を調べたところ、興味深い結果が

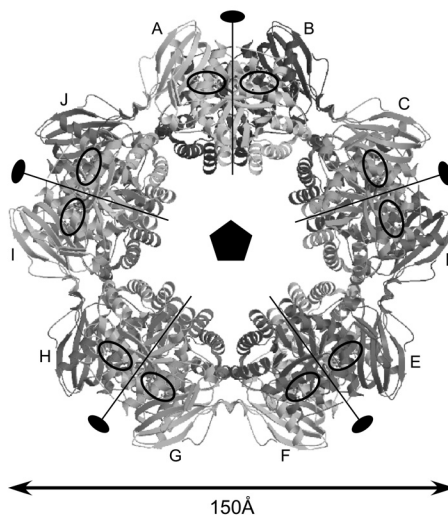


図3. *Tk*-Rubisco の五角形構造

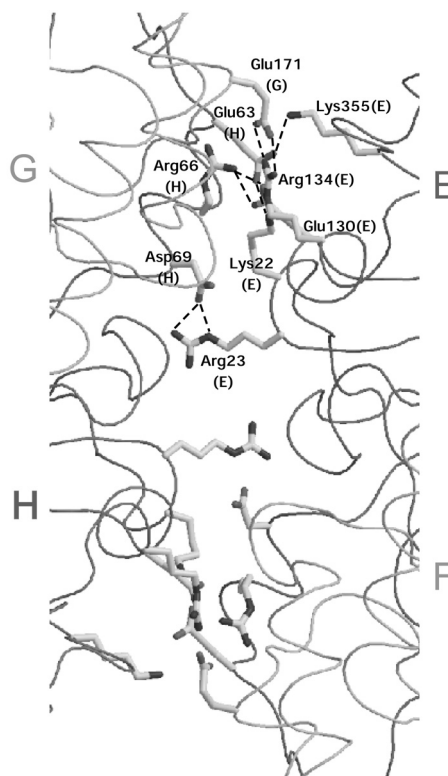


図4. *Tk*-Rubisco の dimer-dimer interface

得られた。すなわち、dimer化した酵素は共通に85°Cから90°Cの間で変性したのに対して、(L₂)₅構造を維持したタンパク質は100°Cでも変性せずに安定に存在した。これらの事実から、*Tk*-RubiscoのL₂dimerは従来のType I、Type II酵素のdimerと比べて高い耐熱性を示すものの、KOD1株の生育温度範囲(65°C~100°C)で機能するためには耐熱性が充分でないことが判明した。そこで特殊な五角形4次構造を形成することにより*Tk*-Rubiscoはさらに高度な耐熱性を獲得し、100°Cでも安定性を示すタンパク質になると考えている。

- ③ 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。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。構造的には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ことが知られている。我々は今までにKOD1株のLon protease(*Tk*-Lon)について、遺伝子の構造解析、組換え型酵素の生化学的解析を行ってきた。*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。*Tk-lon*の過剰発現を試みた結果、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。興味深いことに、*Tk*-LonのATPase活性ドメイン中に既存のLon proteaseには見られない2つの膜貫通領域の存在が示唆された。そこで、KOD1株の細胞質画分・膜画分を分離し、Western blot解析を行ったところ、*Tk*-Lonは膜画分に存在することが判明した。従来のLon proteaseと異なり、*Tk*-Lonは膜結合型酵素であることが明らかとなった(図5)。ゲノムの全塩基配列が決定された超好熱始原菌について*Tk-lon*と相同性の高い遺伝子の検索を行ったところ、全ての種において本遺伝子は存在し、全て膜貫通領域を有していた。このことから、始原菌の*Tk*-Lonは一般的に膜結合型酵素であることが示唆された。

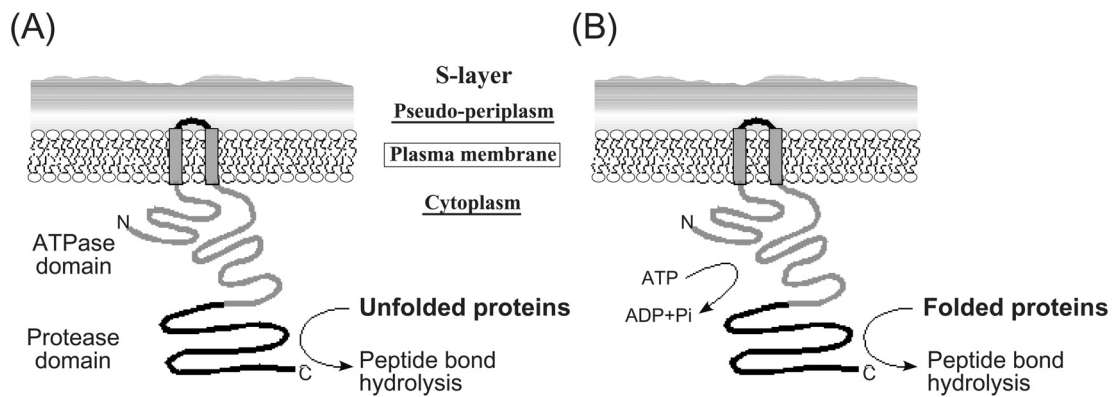


図5. Tk-Lon の機能モデル

- ④ Hydrogenase: Hydrogenase はプロトン(H^+)を電子受容体として水素ガス(H_2)を発生させる酵素であり、水素ガスの有効な生産手段の一つとして注目を集めている。我々は KOD1 の耐熱性 hydrogenase に着目し、遺伝子の単離および酵素の精製を試みた。遺伝子解析の結果、KOD1 株の hydrogenase オペロンは 4 つの ORF (*Tk-hydBGDA*)から構成されており、そのうち *Tk-hydDA* が[NiFe] hydrogenase の small subunit および large subunit とそれぞれ相同性を有していた。

抗 *Tk-HydA* ポリクローナル抗体を調製し、これを用いた免疫化学的手法により KOD1 株の細胞抽出液より hydrogenase の精製を行った。精製画分の解析の結果、本酵素は *Tk-hydBGDA* の各 ORF に対応する 4 種類のタンパクからなるヘテロテトラマー構造をとっており、その至適温度は水素発生反応で $90^\circ C$ 、水素酸化反応で $95^\circ C$ であった。また熱安定性について解析を行った結果、半減期($t_{1/2}$)は $80^\circ C$ において 218 分、 $90^\circ C$ においては 18 分であった。含有金属の解析の結果、本酵素中には Ni および Fe がそれぞれ約 1 分子および約 20 分子(ヘテロテトラマー構造あたり)含まれていた。水素酸化反応における電子受容体に $NADP^+$ が利用可能であったことから、生理学的反応においては $NADPH$ を利用した水素発生が行われていることが推測された。我々はまた、hydrogenase の機能発現機構について検討を加えた。

一般に *in vivo* における hydrogenase の活性化には、翻訳終了後に複数の補助タンパクによる成熟化過程が必要である。そこで KOD1 由来 hydrogenase 遺伝子および hydrogenase 成熟化遺伝子を大腸菌内で発現させ、*in vitro* においてその成熟化過程を再現させることを試みた。KOD1 ゲノム DNA ライブラリーより、既知の hydrogenase 成熟化遺伝子 (*hyp* 遺伝子群)と相同性のある ORF を含むフェージクローン (*HypC3-1*)を単離した。*HypC3-1* 中には、*hyp* 遺伝子群と相同性のある ORF が 4 つ (*hypA*, *C*, *D*, *F*) 確認された。この中で、成熟化の初期段階に活性中心を持つ large subunit 前駆体と会合することが知られている *hypC* ホモログ (*Tk-hypC*, 228bp) に着目し、その大腸菌内での発現・精製を行った。この *Tk-HypC* を、成熟化を受けると予測されるヒドロゲナーゼ large subunit 前駆体 (*Tk-HydA*) と混合し、非変性-PAGE に供したところ、両者の会合を示唆する結果を得た。部位特異的置換により本会合は双方のタンパク質に存在する

cysteine 残基を介して行われていることが明らかとなった。現在は *Tk-HypD* と *Tk-HydA* の間の相互作用を検討している。

- ⑤ 始原菌の解糖系酵素 fructose 1,6-bisphosphate aldolase・pyruvate kinase:我々は超好熱始原菌 *T. kodakaraensis* KOD1 の中央代謝系において重要な酵素である fructose 1,6-bisphosphate aldolase (FBP aldolase)、pyruvate kinase に注目し、各遺伝子のクローニング、大腸菌内における組換えタンパクの発現、精製および生化学的特性の解析を行った。大腸菌の Class I aldolase 遺伝子 *dhnA* と相同性の高い KOD1 株の FBP aldolase 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発現、精製を行った。その結果、組換え型タンパク質は顕著な FBP aldolase 活性を有することが判明した。Subunit 分子量は 31.2kDa であり、ゲル濾過クロマトグラフィーにより十量体構造を有することが示唆された。酵素の生化学的特性の解析を行ったところ、EDTA により反応が阻害されないことから金属イオン非依存的な Class I タイプであると考えられた。一方、100°Cにおける相対活性の半減期は 66min と高い耐熱性を有していた。反応至適 pH はクエン酸存在下で pH 6.5、非存在下で pH 5.0 であった。Effector について検討を行ったところ、FBP 開裂反応の促進剤として phosphoenolpyruvate, citrate, pyrophosphate、阻害剤として erythrose 4-phosphate が見出されたが、縮合反応に対してはこれらの化合物による顕著な効果は見られなかった。また、我々は *T. kodakaraensis* KOD1 のゲノム解析により pyruvate kinase に相同なタンパクをコードする遺伝子を見出した。アミノ酸配列の相同性解析から本酵素は細胞内エネルギーチャージによって調節をうける type II に属すると推定された。

本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発現および精製を行い、ADP 依存的な pyruvate kinase 活性を確認した。サブユニット分子量は 52.7kDa(479 aa)であり、ゲル濾過クロマトグラフィーにより五〜六量体構造を有することが示唆された。

- ⑥ 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。我々はこれまでに、KOD1 株の DNA ligase 遺伝子一次構造を解析し、組換え型酵素 (*Tk-Lig*) の生化学的性質を明らかにしてきた。興味深い特性として、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、本酵素が 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 活性も有したこと、などが挙げられた。平成 13 年度では高温環境での本酵素のさらなる反応解析を行った。*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。また、補因子についても dATP、ddATP などでも活性が確認され、本酵素は多様な補因子要求性を有する DNA ligase であることが示された。一方で DNA 基質の詳細な検討から、本酵素は連結部位において「ミスマッチしている DNA」も「オーバーラップしている DNA」も連結できることが確認された。

(2) 新規好気性超好熱始原菌 *Pyrobaculum calidifontis* VA1 株の解析と有用酵素の同定

我々は今までに好気条件下で生育する超好熱菌 *Pyrobaculum calidifontis* VA1 株の単離と同定を行ってきた。VA1 株の最適生育条件は、大気条件下で温度 90~95°C、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(表 1)。平成 13 年度には VA1 株より工学的に有用な 2 つの酵素 catalase および esterase に注目して研究を進めた。中でも活性酸素除去酵素の一つである catalase については、好気条件下で生育した VA1 細胞に顕著な catalase 活性が認められた。嫌気条件下では活性が検出できなかったことから、本酵素は好気条件下で誘導されることが示唆された。VA1 株より catalase を精製したところ、①吸光スペクトル、②阻害剤の影響、③含有金属、から非 heme 型 catalase (Mn catalase) であることが判明した。

表 1. VA1 株と他の *Pyrobaculum*・*Thermoproteus* 属始原菌との生理学的特性比較

	Strain VA1	<i>P. aerophilum</i>	<i>P. oguniense</i>	<i>P. islandicum</i>	<i>P. organotrophum</i>	<i>P. arsenaticum</i>	<i>T. tenax</i>	<i>T. neutrophilus</i>	<i>T. uzoniensis</i>
Morphology	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod
Growth condition									
Temperature (°C)									
Optimum	90-95	100	90-94	100	102	n.d.	88	85	90
Range	75-100	75-104	70-97	74-102	78-102	68-100	≤ 96	n.d.	74-102
pH									
Optimum	7	7	6.3-7.0	6	6	n.d.	5	6.5	5.6
Range	5.5-8.0	5.8-9.0	5.4-7.4	5-7	5-7	n.d.	2.5-6	n.d.	4.6-6.8
Salt conc. (%)									
Optimum	0	1.5	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Range	0-0.8	0-3.6	0-1.5	≤ 0.8	≤ 0.5	0-3	n.d.	n.d.	n.d.
Oxygen	facultatively aerobic	facultatively microaerobic	facultatively aerobic	strictly anaerobic	strictly anaerobic	strictly anaerobic	strictly anaerobic	strictly anaerobic	strictly anaerobic
autotrophic heterotrophic	/ heterotrophic	facultatively autotrophic	obligately heterotrophic	facultatively autotrophic	obligately heterotrophic	facultatively autotrophic	facultatively autotrophic	facultatively ^c autotrophic	heterotrophic
Electron acceptors	oxygen, nitrate	oxygen, nitrate, arsenate ^a , thiosulfate, selenate ^a , selenite ^a	oxygen, nitrate, thiosulfate, cystine, oxidized glutathione	sulfur, sulfur, thiosulfate, L-cystine, oxidized glutathione, ferric iron ^b , arsenate ^a	sulfur, L-cystine, oxidized glutathione	sulfur, thiosulfate, arsenate, selenate	sulfur, malate	sulfur	sulfur, fermentation
G+C content (mol%)	51	52	48	47	48	58.3	55.3	60 ^d	56.5
References	this study	(Völkli et al. 1993) ^a (Huber et al. 2000)	(Sako et al. 2001)	(Huber et al. 1987) ^b (Huber et al. 2000) ^b (Vargas et al. 1998)	(Huber et al. 1987)	(Huber et al. 2000)	(Zillig et al. 1981)	(Fischer et al. 1983) ^c (Schäfer et al. 1986) ^d (Itoh et al. 1998)	(Bonch-Osmolovskaya et al. 1990)

n.d., not determined

本酵素の遺伝子を単離し、その一次構造を決定した。アミノ酸配列をもとに相同性検索を行ったが、現在までに明らかになっている始原菌(11 株)のゲノム中に本酵素の orthologue は存在しなかった。したがって、本酵素は始原菌には珍しい非 heme 型 catalase であることが判明した。Esterase に関しては、*P. calidifontis* VA1 株の粗酵素液中に esterase 活性を検出した。

そこで、耐熱性 esterase 活性を指標にしたショットガン法により、*Pc-est* 遺伝子を取得した。

その塩基配列を解析したところ、*Pc-EST* は 313 アミノ酸残基からなる分子量 34kDa のタンパク質と予想され、ヒト由来の hormone 感受性 lipase と 29%の相同性を示すことが判明した。

本遺伝子を発現ベクターに挿入し、大腸菌を宿主とした遺伝子の発現、及び発現産物 *Pc-EST* の精製を行った。本酵素の生化学的特性解析を行った結果、最適温度は 90°C、最適 pH は 7.0 であった。また、本酵素を 100°C で 2 時間熱保持しても活性の減少はほとんど見られず、本酵素は非常に高い耐熱性を有することが判明した。このことから、*Pc-EST* の様々なバイオプロセスへの応用

が期待できる。

3. 研究実施体制

(1) 新規微生物スクリーニンググループ

① 代表者名:

今中忠行(京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻 教授)

② 研究項目

深度地下極限環境(無酸素、熱水、油田、岩盤)から新規な微生物を分離するとともに、地下微生物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を目指す。

(2) 超好熱菌グループ

① 代表者名

高木昌宏(北陸先端科学技術大学院大学材料科学研究科 教授)

② 研究項目

KOD1 株の酵素は全て優れた耐熱性を有し、その安定性から工業プロセスなどへの利用が期待される。本研究機関では超好熱菌の有用酵素に焦点を当て、それらの応用を検討するとともに、それらの優れた特性の分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。具体的な酵素としては KOD1 株由来の DNA polymerase などを中心に研究を進める。

(3) 耐熱性タンパク質グループ

① 代表者名

藤原伸介(大阪大学大学院工学研究科応用生物工学専攻 助教授)

② 研究項目

KOD1 株の酵素がもつ超耐熱性のメカニズムを明らかにするために、KOD1 株由来の酵素や他の生体分子の精製・結晶化を行っていく。また、KOD1 は生命進化の源流に位置する始原菌でもあり、生命の進化、タンパク質の分子進化に関する知見を得るために、タンパク質の構造と機能の関係を真核細胞、原核細胞由来の酵素と比較していく。

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

2001-2002 年

- “Tumor suppressive monoclonal antibody belonging to the VH7183 family directed to the oncodevelopmental carbohydrate antigen on human hepatocellular carcinoma”, D. Sandee, S. Tungpradabkul, K. Laohathai, B. Punyammalee, K. Kohda, M. Takagi, and T. Imanaka, *J. Biosci. Bioeng.*, 93, 266-273 (2002).
- “Characterization of isocitrate dehydrogenase from the green sulfur bacterium *Chlorobium limicola*: A carbon dioxide-fixing enzyme in the reductive tricarboxylic acid cycle”, T. Kanao,

- M. Kawamura, T. Fukui, H. Atomi, and T. Imanaka, *Eur. J. Biochem.*, 269, 1926–1931 (2002)
- “Cellular toxicity of cadmium ions and their detoxification by heavy metal-specific plant peptides, phytochelatins, expressed in mammalian cells”, M. Takagi, H. Satofuka, S. Amano, H. Mizuno, Y. Eguchi, K. Hirata, K. Miyamoto, K. Fukui, and T. Imanaka”, *J. Biochem.*, 131, 233–239 (2002)
 - “Substrate recognition and fidelity of strand joining by an archaeal DNA ligase”, M. Nakatani, S. Ezaki, H. Atomi, and T. Imanaka, *Eur. J. Biochem.*, 269, 650–656 (2002)
 - “Characterization of an archaeal cyclodextrin glucanotransferase with a novel C-terminal domain”, N. Rashid, J. Cornista, S. Ezaki, T. Fukui, H. Atomi, and T. Imanaka, *J. Bacteriol.*, 184, 777–784 (2002)
 - “Low-temperature lipase from psychrotrophic *Pseudomonas* sp. strain KB700A”, N. Rashid, Y. Shimada, S. Ezaki, H. Atomi, and T. Imanaka, *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 4064–4069 (2001)
 - “Conformational stability of a hyperthermophilic protein in various conditions for denaturation”, K. Shiraki, S. Fujiwara, T. Imanaka, and M. Takagi, *Electrochemistry*, 69, 949–952 (2001)
 - “Different cleavage specificities of the dual catalytic domains in chitinase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1”, T. Tanaka, T. Fukui, and T. Imanaka, *J. Biol. Chem.*, 276, 35629–35635 (2001)
 - “Isolation of bacterial strains colonizable in mosquito larval guts as novel host cells for mosquito control”, P. Luxananil, H. Atomi, S. Panyim, and T. Imanaka, *J. Biosci. Bioeng.*, 92, 342–345 (2001)
 - “Active subtilisin-like protease from a hyperthermophilic archaeon in a form with a putative prosequence”, Y. Kannan, Y. Koga, Y. Inoue, M. Haruki, M. Takagi, T. Imanaka, M. Morikawa, and S. Kanaya, *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 2445–2452 (2001)
 - “Interaction of TIP26 from a hyperthermophilic archaeon with TFB/TBP/DNA ternary complex”, T. Matsuda, M. Fujikawa, M. Haruki, X.F. Tang, S. Ezaki, T. Imanaka, M. Morikawa, and S. Kanaya, *Extremophiles*, 5, 177–182 (2001)
 - “Isolation and characterization of psychrotrophic bacteria from oil-reservoir water and oil sands”, T. Kato, M. Haruki, T. Imanaka, M. morikawa, and S. Kanaya, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 55, 794–800 (2001)
 - “Comparative analyses of the conformational stability between a hyperthermophilic protein and its mesophilic counterpart”, K. Shiraki, S. Nishikori, S. Fujiwara, H. Hashimoto, Y. Kai, M. Takagi, and T. Imanaka, *Eur. J. Biochem.*, 268, 1–8 (2001)
 - “Extracellular synthesis, specific recognition, and intracellular degradation of

- cyclomalto-dextrins by the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. strain B101”, Y. Hashimoto, T. Yamamoto, S. Fujiwara, M. Takagi, and T. Imanaka, *J. Bacteriol.*, 183, 5050–5057 (2001)
- “Metal-binding properties of phytochelatin-related peptides”, H. Satofuka, T. Fukui, M. Takagi, H. Atomi, and T. Imanaka, *J. Inorg. Biochem.*, 86(2/3), 595–602, (2001)
 - “Crystal structure of a novel-type archaeal Rubisco with pentagonal symmetry”, K. Kitano, N. Maeda, T. Fukui, H. Atomi, T. Imanaka, K. Miki, *Structure*, 9, 473–481 (2001)
 - “Methylguanine methyltransferase from *Thermococcus kodakaraensis* KOD1”, M. Takagi, Y. Kai, and T. Imanaka, *Methods Enzymol.*, 334, 239–248 (2001)
 - “RecA/Rad51 homolog from *Thermococcus kodakaraensis* KOD1”, N. Rashid, M. Morikawa, S. Kanaya, H. Atomi, and T. Imanaka, *Methods Enzymol.*, 334, 261–270 (2001)
 - “Chaperonin from *Thermococcus kodakaraensis* KOD1”, S. Fujiwara, M. Takagi, and T. Imanaka, *Methods Enzymol.*, 334, 293–301 (2001)
 - “Evolution of PCR Enzymes: Towards a better PCR system based on a KOD DNA polymerase”, T. Imanaka and M. Takagi, *J. Chin. Inst. Chem. Engrs.*, 32, 277–288 (2001)
 - “Enhanced signal transduction by a directly fused protein of interleukin-6 and its receptor”, H. Mizuguchi, H. Mizuno, K. Yasukawa, T. Ishiguro, K. Fukui, T. Imanaka, and M. Takagi, *J. Biosci. Bioeng.*, 91, 299–304 (2001)
 - “Long and accurate PCR with a mixture of KOD DNA polymerase and its exonuclease deficient mutant enzyme”, M. Nishioka, H. Mizuguchi, S. Fujiwara, S. Komatsubara, M. Kitabayashi, H. Uemura, M. Takagi, and T. Imanaka, *J. Biotechnol.*, 88, 141–149 (2001)
 - “Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from *Thermococcus kodakaraensis* KOD1”, H. Atomi, S. Ezaki, and T. Imanaka, *Methods Enzymol.*, 331, 353–365 (2001)
 - “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)
 - “Thiol protease from *Thermococcus kodakaraensis* KOD1”, 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 temperature 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)
 - “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)
 - “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)
 - “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)
- (2) 特許出願
該当なし