

「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) 新規炭酸固定酵素の発見と解析

我々は全く新規な構造を有する炭酸固定酵素を2種類発見し、その機能特性を解明した。嫌氣的石油分解合成菌 HD-1 株の biotin 依存型 carboxylase は 120kDa の大きさをもつ巨大酵素であり、biotin carboxylase、biotin carboxyl carrier protein、carboxyltransferase と相同的な3つのドメインを含んでいた（図1）。

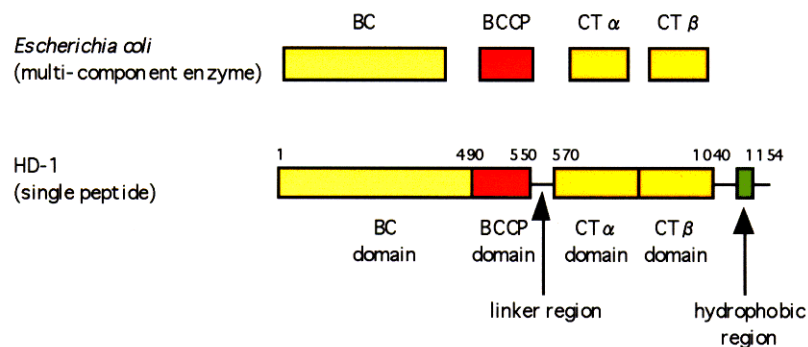


図1. HD-1株の biotin 依存型 carboxylase の構造

単一のポリペプチド上に上記の 3 つの機能が共存している例は原核生物では初めてであり、その炭酸固定能や生理的役割、特にアルカン合成との関連に注目している。また我々は、超好熱始原菌 *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1 株内に ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase (Rubisco) が存在することを発見した。これは超好熱菌としては世界で初めての例であり、欧米の研究者らから大変注目されている。また、結晶化、予備的 X 線解析の結果、本酵素は五角形構造を有していることも判明した。これは Rubisco に限らず、酵素として初めての五角形型のものである (図 2)。さらに、本酵素は既存の Rubisco の中で最高の比活性、最高の carboxylase 特異性を有しており、その生理的役割、構造的特徴の興味はもちろんのこと、その炭酸固定プロセスへの応用も期待される。

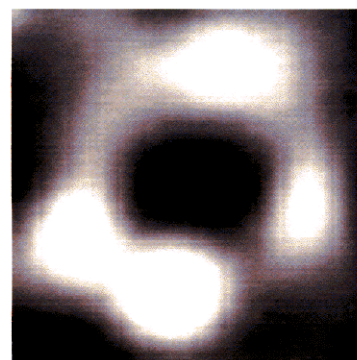


図 2. KOD1 株の Rubisco の電子顕微鏡写真

## (2) 超耐熱性有用酵素の同定と解析

- ① 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、不安定なものであった。我々は、KOD1 株から耐熱性 DNA ligase 遺伝子の構造解析および大腸菌内での大量発現に成功した。発現産物は高い DNA ligase 活性を有しており、熱にも安定であった。このことから、KOD1 株由来 DNA ligase の遺伝子工学分野での応用が期待される。
- ② 糖質関連酵素 :  $\beta$ -1,4 結合を有する糖鎖であるセルロースとキチンは地球上で第一、第二の生産量となるバイオマス資源であり、その有効利用は古くから注目されている。我々は KOD1 株や本プロジェクトで新たに分離した超好熱菌よりこれらを効率よく分解できる耐熱性の carboxymethyl cellulase、 $\beta$ -glycosidase や chitinase の遺伝子を単離し、構造解析および発現産物の酵素学的特徴を明らかにした。 $\beta$ -glycosidase は 100℃で最大の比活性を示し、 $\beta$ -glucosidase、 $\beta$ -mannosidase、 $\beta$ -galactosidase 活性など、幅広い基質選択性を持つことが判明した。Chitinase は 1,236 個のアミノ酸残基からなるタンパク質に対応しており、他生物種では類をみない巨大な酵素であった (図 3)。

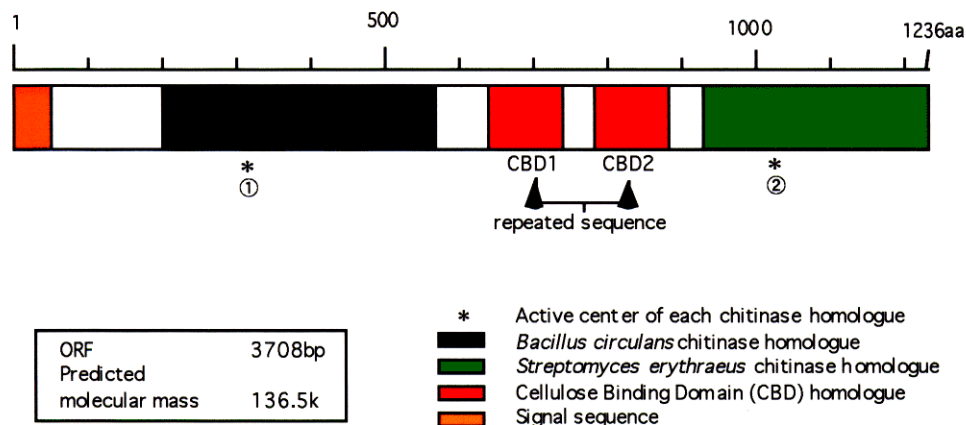


図 3. KOD1 株由来 chitinase の構造

そのアミノ末端側では *Bacillus circulans* の、カルボキシル末端側では *Streptomyces erythraeus* のキチナーゼと高い相同性を示した。いずれの領域においても活性部位であるグルタミン酸、アスパラギン酸が保存され、活性部位を 2 つ持つ双頭構造が認められた。また、この 2 つの保存領域の間にはセルロース結合ドメインが 2 回繰り返して存在していた。発現産物はキチナーゼ活性を有しており、双頭構造の生理的、機能的役割を解析中である。

- ③ 水素発生と耐熱性 hydrogenase : Hydrogenase は水素の関与する酸化還元反応を触媒する酵素であり、これまでに数種が腸内細菌、硝酸菌、藻類などで知られている。水素発生への応用研究は長い間注目されていたが、使用する hydrogenase の熱失活は大きな障壁となっていた。そこで我々は超好熱菌の hydrogenase に着目した。KOD1 株の hydrogenase 遺伝子を解析した結果、4 つの遺伝子がオペロンを形成し、 $\alpha, \beta, \gamma, \delta$  の 4 つのサブユニットに対応していた。水素の酸化反応においては、本 hydrogenase の至適 pH は 9.5 であり、至適温度は約 100℃ であった。反応温度 85℃ でその逆反応である水素発生を試みたところ、顕著な水素生産が確認された (図 4)。このことから、KOD1 株の hydrogenase の水素発生系への応用が期待できる。

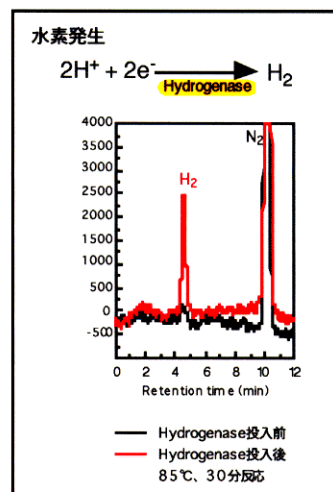


図 4. KOD1 株の hydrogenase を用いた水素生産

(3) 深度地下環境からの新規微生物の分離と解析

我々は新規な酵素のみならず、深度地下環境から地表微生物にはない特徴を有す

る興味深い新規微生物の分離にも成功した。

- ① 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 25℃の至適生育温度を持ち、-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 配列は、最も近い微生物属 (*Arthrobacter*) でも 95%の相同性しか示さず、新属新種の微生物である可能性が示唆された。また、KB700A 株 (図 5) 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考えている。

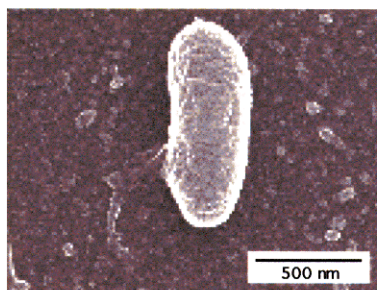


図 5. KB700A 株の電子顕微鏡写真

- ② 新規超好熱菌：我々はまた、温泉サンプルより 100℃という高温でも生育できる新たな超好熱菌を分離することができた。本菌は *P. kodakaraensis* KOD1 とは異なり、形態は桿菌であり、酸素存在下でも生育可能であった。このことから、本菌の代謝や呼吸系などは KOD1 株のものと大きく異なる可能性がある。また、本菌には酸素感受性の酵素は少ないと予想され、超耐熱性バイオマテリアルの新たな源として期待できる。

### 3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

- "Ion pairs involved for maintaining a thermostable structure of glutamate dehydrogenase (GDH) from a hyperthermophilic archaeon" R. N. Z. A. Rahman, S. Fujiwara, H. Nakamura, M. Takagi and T. Imanaka, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 248, 920-926, (1998).
- "Sequence analysis of glutamate dehydrogenase (GDH) from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus* sp. KOD1 and comparison of enzyme characteristics of native and recombinant GDHs" R. N.Z. A. Rahman, S. Fujiwara, M. Takagi

- and T. Imanaka, *Mol. Gen. Genet.*, 257, 338-347 (1998).
- "Comparison of two glutamate producing enzymes from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus* sp. KOD1" B. Jongsareejit, S. Fujiwara, M. Takagi and T. Imanaka, *FEMS Microbiol. Lett.*, 158, 243-248 (1998).
  - "The O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase from a hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus* sp. KOD1: a thermostable repair enzyme" M. M. Leclere, M. Nishioka, T. Yuasa, T. Fujiwara, S. Takagi and T. Imanaka, *Mol. Gen. Genet.*, 258, 69-77 (1998).
  - "Rational design for stabilization and optimum pH shift of serine protease AprN" A. Masui, N. Fujiwara, K. Yamamoto, M. Takagi and T. Imanaka, *J. Ferment. Bioeng.*, 85, 30-36 (1998).
  - "Characterization of two intein homing endonucleases encoded in the DNA polymerase gene from *Pyrococcus kodakaraensis* strain KOD1" M. Nishioka, S. Fujiwara, M. Takagi and T. Imanaka, *Nucleic Acids Res.*, 26, 4409-4412 (1998).
  - "Phylogenetic analysis and effect of heat on conformational change of ferredoxin from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus* sp. KOD1" M. A. Siddiqui, S. Fujiwara, M. Takagi and T. Imanaka, *J. Ferment. Bioeng.*, 85, 271-277 (1998).
  - "Crystal structure of aspartyl-tRNA synthetase from *Pyrococcus kodakaraensis* KOD; archaeon specificity and catalytic mechanism of adenylate formation" E. Schmitt, L. Moulinier, S. Fujiwara, T. Imanaka, J. Thierry and D. Moras, *EMBO J.*, 17, 5227-5237 (1998).
  - "Archaeon *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1: application and evolution" S. Fujiwara, M. Takagi and T. Imanaka, *Biotechnol Annu. Rev.*, 4, 259-284 (1998).
  - "Gene cloning and characterization of recombinant RNase HII from a hyperthermophilic archaeon" M. Haruki, K. Hayashi, T. Kochi, A. Muroya, Y. Koga, M. Morikawa, T. Imanaka and S. Kanaya, *J. Bacteriol.*, 180, 6207-6214 (1998).
  - "In vitro heat effect on heterooligomeric subunit assembly of thermostable indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase" M.A. Siddiqui, S. Fujiwara, M. Takagi and T. Imanaka, *FEBS Lett.*, 434, 372-376 (1998).
  - "Thermostable glycerol kinase from a hyperthermophilic archaeon: gene cloning and characterization of the recombinant enzyme" Y. Koga, M. Morikawa, M. Haruki, H. Nakamura, T. Imanaka and S. Kanaya, *Protein*

- Engineering, 11, 1219-1227, (1998).
- "Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of archaeal O<sup>6</sup>-methylguanine- DNA methyltransferase" H. Hashimoto, M. Nishioka, T. Inoue, S. Fujiwara, M. Takagi, T. Imanaka and Y. Kai, *Acta Crystallographica*, D54, 1395-1396, (1998).
  - "Production of alkane and alkene from CO<sub>2</sub> by a petroleum-degrading bacterium" M. Morikawa, T. Iwasa, S. Yanagida and T. Imanaka, *J. Ferment. Bioeng.*, 85, 243-245, (1998).
  - "Presence of a structurally novel type ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1" S. Ezaki, N. Maeda, T. Kishimoto, H. Atomi and T. Imanaka, *J. Biol. Chem.*, 274(8), 5078-5082, (1999).
  - "A unique DNase activity shares the active site with ATPase activity of RecA/Rad51 homologue (Pk-REC) from a hyperthermophilic archaeon" N. Rashid, M. Morikawa, S. Kanaya, H. Atomi and T. Imanaka, *FEBS Letters*, 445(1), 111-114, (1999).
  - "Isolation and characterization of a second subunit of molecular chaperonin from *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1: Analysis of ATPase deficient mutant" M. Izumi, S. Fujiwara, M. Takagi, S. Kanaya and T. Imanaka, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 1801-1805, (1999).
  - "Crystallographic studies on family B DNA polymerase from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus kodakaraensis* strain KOD1" H. Hashimoto, T. Matsumoto, M. Nishioka, T. Yuasa, S. Takeuchi, T. Inoue, S. Fujiwara, M. Takagi, T. Imanaka and Y. Kai, *J. Biochem (Tokyo)*, 125, 983-986, (1999).
  - "Gene cloning and characterization of aldehyde dehydrogenase from a petroleum degrading bacterium strain HD-1" N. Okibe, K. Amada, M. Haruki, T. Imanaka, M. Morikawa and S. Kanaya, *J. Biosci. Bioeng.*, 88(1), 7-11, (1999).
  - "Analysis of DNA compaction profile and intracellular contents of archaeal histones from *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1" H. Higashibata, S. Fujiwara, M. Takagi and T. Imanaka, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 258, 416-424, (1999).
  - "Characterization of petroleum degrading bacteria from oil contaminated sites in Vietnam" N. Q. Huy, S. Kin, K. Amada, M. Haruki, N. B. Huu, D. T. Hang, D. T. C. Ha, T. Imanaka, M. Morikawa and S. Kanaya, *J. Biosci. Bioeng.*, 88(1),

100-102, (1999).

- "Purification and characterization of an extremely thermostable cyclomalto-dextrin glucanotransferase from a newly isolated hyperthermophilic archaeon, a *Thermococcus* sp." Y. Tachibana, A. Kuramura, N. Shirasaka, Y. Suzuki, T. Yamamoto, S. Fujiwara, M. Takagi and T. Imanaka, Appl. Environ. Microbiol., 65, 1991-1997, (1999).
- "Isolation and characterization of psychrotrophs from subterranean environments " N. Rashid, H. Kikuchi, S. Ezaki, H. Atomi and T. Imanaka, J. Biosci. Bioeng., 87(6), 746-751, (1999).
- "Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1 is composed solely of large subunits and forms a pentagonal structure" N.Maeda, K. Kitano, T. Fukui, S. Ezaki, H. Atomi, K. Miki and T. Imanaka, J. Mol. Biol., 293(1), 57-66, (1999).