

海洋性超好熱菌の探索とスーパー機能開発

京都大学大学院農学研究科応用生物科学専攻
海洋分子微生物学分野
左子 芳彦

1. はじめに

深海探査船の開発により、世界中の海洋底のプレート境界や海嶺より 300℃以上の深海熱水孔が発見され、このような極限環境に生息する超好熱菌の多くが古細菌に属することから大きな注目を集めている。そして太陽エネルギーに全く依存しない深海熱水孔の生態系構築において、海洋底からもたらされる膨大な化学エネルギーや、様々な物質の微生物変換や生物生産過程に重要な役割を果たしている多様な超好熱菌の性状とその遺伝子資源としての価値に大きな関心が集まり研究が開始されている(1)。

従来このような極限環境には限られた微生物のみが生息すると考えられてきたが、近年の16S rRNA 遺伝子を用いた分子系統解析により極めて多様な未知微生物群の存在が明らかになってきた。これまで分離された超好熱菌はほとんどが培養困難な嫌気性菌で研究の発展に障害となっていたが、環境ゲノムから直接遺伝子の探索、機能解析とその発現・利用を試みる研究が始まっている。超好熱菌は分子系統樹の根元に位置する種が多いため生命の起源と進化を探る最適生物であるばかりではなく、全ゲノム塩基配列の解析とも相まって未知の代謝系や触媒機能を有する未開拓の好熱遺伝子資源として益々重要性が増している。

2. 海洋熱水環境の生態系と超好熱菌の多様性

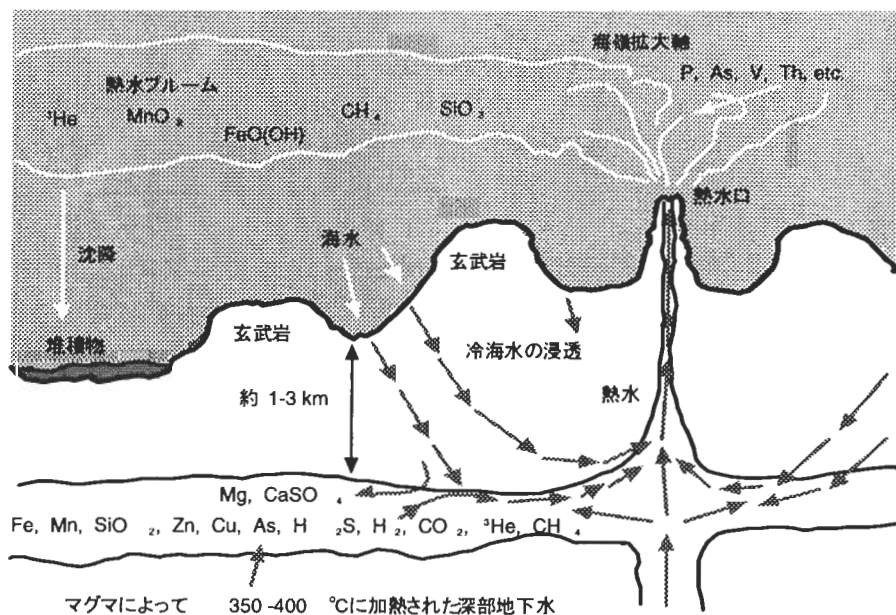


図1. 海底熱水噴出孔の地球化学的環境

海洋底プレートの形成域であるリフト系は、マントルの物質やエネルギーが地表にもたらされる場であり、海洋底の拡大と冷却により、地球内部から散逸する熱の約 2/3 が放出される。近年この様なプレート境界や海嶺より、大西洋中央海嶺(TAG マウント, 3640m)、東太平洋海膨(2500m)、沖縄トラフ(1200m)や小笠原水曜海山(1300m)等多様な海底熱水孔が発見され地球化学的、微生物学的研究が盛んである。その結果、熱水噴出孔周辺には無脊椎動物や甲殻類を含む高密度で特異な生物群集を維持する生態系が存在することが明らかになってきた。時に 300℃以上の熱水となり高濃度で還元性の強い H₂S、CH₄、H₂ や重金属を含有し海水との混合により極めて多様な微環境が形成される。図 1 には熱水活動域における化学反応過程を模式的に示した。太陽光が到達しないため光合成に依存しない深海熱水生態系では、熱水由来の H₂S や CH₄ 等の還元物質を酸化し得る好熱性化学合成独立栄養細菌が一次生産を担っていると考えられている。しかし現場における試料採取や培養の困難さからこれまで研究が進展しにくい状況であった。

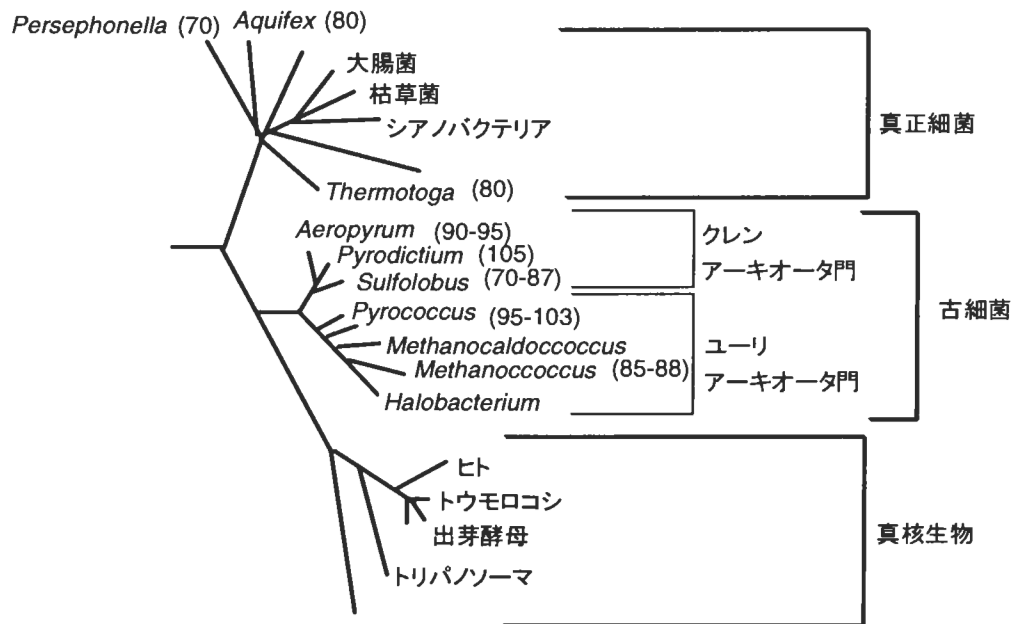


図 2. 全生物界の分子系統樹(Woese et al.,1990 を改変).
超好熱菌を含む枝には、()内に至適増殖温度を付記した。

超好熱菌とは、至適増殖温度が 80℃以上または 90℃以上で増殖可能な微生物群と定義されており、これまで 27 属 70 種以上の超好熱性メタン生成古細菌、硫酸還元性古細菌、硫黄代謝超好熱古細菌と、真正細菌の *Thermotogales* 目、*Aquifex* 属が知られている。図 2 は全生物界の分子系統樹と、代表的な超好熱菌の系統関係を示したものである。16S rDNA (リボソーム RNA 遺伝子) の塩基配列に基づく系統分類では古細菌はさらに 2 つの門、クレンアーキオータ (Crenarchaeota) とユーリアーキオータ (Euryarchaeota) に分けられ、超好熱菌はその両方に含まれることから系統的にも生理的にも多様な微生物群である。超好熱菌の大部分が嫌気性であるが、一般にこれらの嫌気性菌は、独立栄養的に増殖するか

従属栄養的に増殖するかの違いはあっても、分子状 H_2 を電子供与体とした S 呼吸によりエネルギーを獲得する代謝様式を持つものが多い。嫌気性古細菌のうちで、*Desulfurococcus* 属、*Pyrodictium* 属、*Pyrococcus* 属および *Thermococcus* 属のいくつかの種は S^0 と H_2 の両方、あるいは S^0 または H_2 のどちらか一方の非存在下でも嫌氣的に増殖し得ることから、発酵代謝の経路があることが示唆される。古細菌 *Aeropyrum* 属は絶対好気性の生物種のうちで最も増殖温度が高い（至適増殖温度：90–95℃）(2)。好酸性古細菌 *Sulfolobus* 属(本属は陸上の酸性温泉に生息する)は pH2–3 において好氣的に増殖するが、独立栄養と従属栄養増殖がともに可能である。メタン生成古細菌は偏性嫌気性の独立栄養で、 H_2+CO_2 、ギ酸、酢酸、メタノール、メチルアミンなどから CH_4 を生成する。真正細菌の *Aquifex* 属は好熱性の水素細菌である。これまで分離されてきた超好熱菌の大部分は古細菌に属しそのほとんどが嫌気性でありまた海洋由来である。高温かつ嫌気性という培養の煩雑さや増殖の遅さと低収量から、多様性と新規性を有しながら研究や利用上問題となっていた。

好気性超好熱古細菌として最も高温で増殖が可能な *Aeropyrum pernix* は、これまで好気性では不可能と考えられていた 90℃ 以上で良好な増殖が可能な絶対好気性の特異な超好熱古細菌である。本種はトカラ列島の浅海熱水孔から分離され、その後も九州の沿岸熱水環境から分離されている。一方最近分離された *A. camini* (3) は、小笠原トラフ水曜海山の深海熱水孔のチムニー外壁から分離された同様な生理特性を有する好気性超好熱古細菌である。これらの種は現在日本近海の熱水孔以外では報告が無い特徴的な古細菌である。これまで 16S rRNA 遺伝子クローン解析でその存在が推測されながら分離が困難であった種において、酸素濃度が数パーセント以下を示す微好気性で独立栄養性の好熱菌が多く含まれる可能性が示唆されている。これらの種は分離・培養が困難であるため、これまでその生理学的特徴や現場における生態学的な役割が不明であったが、今後より詳細な研究が求められている。

そこで近年熱水孔チムニー構造物から直接 DNA を抽出して、16S rRNA 遺伝子を PCR 法により増幅して分子系統解析を行い難培養性の好熱菌の生態系を明らかにする研究がなされてきた。その結果、表層域では超好熱性発酵古細菌サーモコッカス目 (*Thermococcales*) が最も高い生菌数を示し、ついで好熱性水素/硫黄酸化細菌アクイフェックス目 (*Aquificales*)、そして常温性–中等度好熱性水素/硫黄酸化細菌イプシロン–プロテオバクテリア (*epsilon-Proteobacteria*) の順であった。チムニー表層では微生物群集の多様性および培養可能な微生物の割合が最も高く、チムニー表層域ほど微生物活動が高いことが示唆された。これまでの分子生態学的研究で、世界各地の熱水環境において沖縄トラフの伊平屋北熱水孔でも確認された機能未知の *epsilon-Proteobacteria* が普遍的に優占し、噴出孔近傍における重要な一次生産者であると考えられていた。本系統群は、その優占環境の広がりも顕著である上に系統学的多様性が高く、現在 5 つのサブグループに分類されている。本系統群はこれまで難培養性であったが、我々の研究でこれまで未分離であったほぼすべてのグループにわたる種を分離することに成功している (4-7)。その結果多様な *epsilon-Proteobacteria* は、水素、チオ硫酸、元素状硫黄、硝酸、酸素など様々な電子受容体、電子供与体の組み合わせを用いて増殖する化学合成独立栄養細菌であることが明らかになり、現場の硫黄、水素、窒素化合物のフラックスに重要な役割を果たしていることが

示唆されている(8)。

今後は特異的な DNA プローブを用いた蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション(FISH)法や Real time PCR 法などによって、視覚・定量化による証明が急務である。また培養が困難な場合は、生息環境全体の DNA ライブラリーを構築して目的遺伝子の検索・定量や発現解析が必要と考えられる。

3. 超好熱菌の全ゲノム塩基配列解析

昨今の超好熱菌ゲノム解析の進行は、研究戦略の面でも研究手法の面でも新時代の到来を予感させるものがある。その背景には、超好熱菌の遺伝情報の全てであるゲノムを断片的ではなくゲノム全体として取り扱い、その生物機能的側面からの解析を体系的かつ網羅的に行うことによって、ゲノム全塩基配列データを生物学的に意味のあるものに統合していこうという考え方がある。系統樹の根元に位置する超好熱菌が代謝・増殖・環境応答・極限環境への適応などの諸機能においていかに常温性の真正細菌や真核生物と異なる生命システムを有しているかを解明するために、またゲノムに潜在する未開拓有用遺伝子資源の開発において、ゲノム解析の成果が威力を発揮するのではないかと期待されている。

表 1 全塩基配列解析が終了した代表的な超好熱菌ゲノムの特徴

生物種	ゲノムサイズ (Mbp)	総遺伝子数 ^a	機能未知遺伝子の数 ^b	ユニークな遺伝子 ^c
古細菌				
クレンアーキオータ界				
<i>Aeropyrum pernix</i> K1	1.67	1,892(0.88)	959(51%)	649(34%)
<i>Pyrobaculum aerophilum</i> IM2	2.22	2,695(0.82)	n.e.	n.e.
<i>Sulfolobus solfataricus</i> P2	2.99	3,033(0.99)	1,510(50%)	1,068(35%)
ユーリアーキオータ界				
<i>Archaeoglobus fulgidus</i> DSM4304	2.18	2,437(0.89)	1,315(54%)	533(22%)
<i>Methanococcus jannaschii</i> DSM2661	1.66	1,772(0.94)	826(47%)	352(20%)
<i>Pyrococcus horikoshii</i> OT3	1.74	1,850(0.94)	850(46%)	403(22%)
<i>Methanopyrus kandleri</i> AV19	1.69	1,729(0.97)	n.e.	n.e.
真正細菌				
<i>Thermotoga maritima</i> MSB8	1.86	1,877(0.99)	660(35%)	322(17%)
<i>Aquifex aeolicus</i> VF5	1.50	1,580(0.99)	466(29%)	208(13%)

a. ()内は 1 遺伝子あたりのゲノムサイズ(kbp)

b. 相同性検索の結果、機能が推定できない遺伝子数。()内は総遺伝子に対する割合

c. 他生物に相同遺伝子が見いだされない遺伝子数。()内は総遺伝子に対する割合

n.e. not estimated

表 1 に、既に全塩基配列の解析が終了した代表的な超好熱菌ゲノムで、そのデータが公表されているものの特徴を示した。ゲノムサイズはおよそ 1.5–2Mbp であり、大腸菌(4.6Mbp)、枯草菌(4.2Mbp)、シアノバクテリアゲノム(3.6Mbp)に比較して小さいと言える。また 1 遺伝子当たりの平均ゲノムサイズが全て 1kbp を下回り、ゲノムの上に稠密に遺伝子が分布していることがうかがえる。好気性の超好熱菌 *Aeropyrum pernix* ゲノムには機能未知遺伝子が 51% に達し、他生物に相同遺伝子が見出されない遺伝子の割合は 34% にものぼる。全ゲノム塩基配列の解読が終了した超好熱菌において今後の最大の課題は、機能未知遺伝子群をいかに効率的にゲノム規模で同定し、有用遺伝子の発現・開発を行うことである。ポストゲノム研究では、上記のような膨大なデータの中から目的遺伝子の発掘

をいかに効率よく行うかが重要な課題であるが、その成否を左右するいくつかの方法論も整備されてきている。その第一が「バイオインフォマティクス」である。例えば、各生物種の遺伝子セットから代謝系および制御系(シグナル伝達系、膜タンパク質による輸送、転写、翻訳系などを含む)の各経路を、情報学的に再構築するツールとして KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes ; <http://www.genome.ad.jp/kegg/>)が開発され成果をあげている。KEGG では、特定の酵素反応に対する代替経路を探索する機能も備えられている。

図3に、ゲノム情報から KEGG などを用いて推定される超好熱古細菌 *Aeropyrum pernix* の基本代謝経路を示した(9)。このような情報学的手法を用いて再構築された細胞像と実際に観察される現象とのギャップを明確にし、その missing link を埋めるための実験系を組めば、従来の方法に比してはるかに効率よく現象の解明に至ることが可能と思われる。

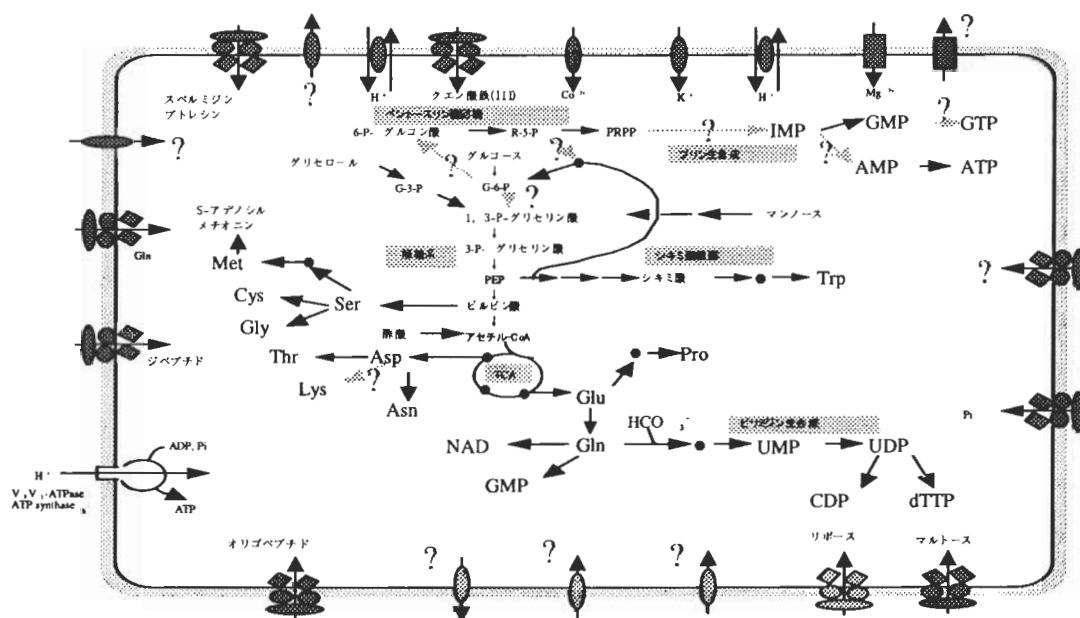


図3 *Aeropyrum pernix* K1 株の全ゲノム塩基配列情報から KEGG などを用いて推定される基本代謝経路

実際情報学的解析により *Aeropyrum pernix* のゲノムデータにはバリン、ロイシン、イソロイシンなどの分岐鎖アミノ酸合成系に関する遺伝子群が欠損していることが予測されたが、著者らの実験から本種の増殖には少なくともこれら3種のアミノ酸が必須であることが確認された。第二に、遺伝子機能を探るための有力な方法論として「逆遺伝学」の手法がある。古細菌は細菌とも真核生物とも異なる「第三の」系統進化的位置を占める。そのため古くから知られていた他の生物遺伝子との配列類似性が低く、機能推定が困難な未知遺伝子群がゲノム上に数多く見出されている(全遺伝子の約17~36%)。ゲノム情報に基づいて遺伝子破壊株を作製し、それらの表現型を解析すれば、未知遺伝子機能を実験的に推定することが可能となる。既に数種の超好熱古細菌で相同組み換え能を利用した遺伝子破壊の実験が原理的に可能であることが示されている。

私達の研究グループでも、遺伝子機能解析の目的で *A. pernix* を材料として逆遺伝学の手法を開発した。その結果、まず 耐熱性選択遺伝マーカーとしてピリミジン生合成系の *pyrFE* 遺伝子を利用して、90℃の高温でも融解しないゲランガム(Gellan Gum) プレート培地上で、*pyrFE* 欠失株と野生株をウラシル要求性/5-FOA(フルオロオロト酸)耐性の有無により選別できる系を確立した。次に、染色体 DNA と部分的に相同領域を有する線状 DNA 断片を古細菌細胞に導入し、相同組み換え能を利用して標的遺伝子をワンステップで破壊する手法を確立した。電気穿孔法により導入する DNA 断片は、*M. HaeIII* で予めメチル化することにより宿主の制限修飾系のバリアを乗り越えることが可能であることを示した。これらの成果によって、古細菌でも系統的に遺伝子破壊株が作製可能であることが明らかになってきた。現在までに日本、米国、フランスの研究グループがそれぞれ独立に古細菌の全ゲノム塩基配列の解析を完了しているが、この遺伝子破壊の手法は、国際的共同研究体制によって遺伝子破壊株コレクションを構築し、古細菌ゲノム生物学を推進してゆくための基盤となるものとして期待されている。

第三に、「構造ゲノミクス」の方法論が急速に台頭し現在は国際的にも研究の重点はプロテオームやメタボローム解析に移っている。すなわち機能未知タンパク質の立体構造の情報や代謝過程に関する情報から、逆にその遺伝子機能の解明に至る試みが模索されている。以上のような方法論を駆使して、新規の物質変換経路や特異な性状を有する酵素反応を解明することにより、医学的な診断用の酵素や耐熱性のバイオセンサー、あるいは種々の食品加工や工業生産プロセスに寄与しうる超好熱菌由来の新規遺伝子資源の開発が期待されている。

4. 好熱遺伝子資源の開発

これまでおよそ 70 種以上の超好熱菌が分離されている。これらの生産する有用耐熱酵素は近年多く報告され始めた、遺伝子増幅(PCR)に必須の DNA ポリメラーゼ、タンパク質を分解するプロテアーゼや多糖を分解するグリコシダーゼ等がほとんどであり、また生産菌も限られている。これは培養条件の困難さ、細胞収量や増殖率の低さに起因する。現在商品化されている酵素はいずれも使用可能温度が 80℃以上で、極めて強い耐熱性を有しており、将来的にはゲノム科学、医学、合成化学、食品加工や環境修復等の広範囲の分野に利用が期待されている。また酵素のみならず好熱微生物群そのものを用いた高温型排水浄化が事業化されており、エネルギー変換や生産、環境修復やバイオテクノロジーへの可能性も有望視されている。

本講演では我々がこれまでに分離してきた超好熱古細菌の rRNA 遺伝子構造の包括的な比較解析(10-13)から、イントロン転移に関する極めて認識部位の長い特異的な新規エンドヌクレアーゼとバイオ水素生産に有望なヒドロゲナーゼ(14)について紹介する。

超好熱菌のイントロンに関する一連の研究で、①Crenarchaeota 門に属する種の rDNA には可動性イントロンが散在する。②イントロンの挿入が頻発するホットスポットは rDNA 領域の 19 箇所限定される。③可動性イントロンの内部にはホーミングエンドヌクレアーゼ(HEase)遺伝子があり、これまでに認識部位の異なる約 20 種の HEase を見出した。そこで可動性イントロンがいかにして転移標的を選択するのかを検討するために、ホーミングエンドヌクレアーゼの DNA 塩基配列認識機構と立体構造に焦点を絞って研究を進めてき

た。ここでは、これら酵素の代表的な例として *A. pernix*K1 株の 16S rDNA イントロン由来の I-ApeI(5'-CAAGGCTGAAAC*TTAAA-3')の 17 塩基対を認識し、3'末端に 4 塩基の突出を残して切断する。*は切断部位を示す。至適反応温度は 90℃)、同株の 23S rDNA イントロン由来の I-ApeII(5'-CTGACTCTCTTAA*GGTAGCCAA の 22 塩基対を認識し、3'末端に 4 塩基の突出を残して*の位置で切断を行なう。至適反応温度は 90℃)を取り上げ、新規に見出された LAGLIDADG ファミリー HEases の機能と構造について解析した。その結果、いずれの HEase とも多くの塩基置換パターンに寛容であり、HEase は長い塩基配列を低い厳密性で認識することにより、高い基質特異性と基質多選択性を両立させていると考えられた。また本酵素への変異導入により、多様な目的酵素を開発している。従って HEase は低頻度 DNA 切断酵素(rare cutter)として、ゲノム地図作成や臨床遺伝子検査に有用である。

近年、環境に対して最も負荷の少ない水素エネルギーの生産に向けて、持続可能なバイオプロセスによる水素生産が注目されている。微生物の代謝を利用した水素生産に関する研究で注目されている酵素ヒドロゲナーゼは、これまで多くの研究がなされてきたが利用面では耐熱性や酸素耐性において大きな問題点があった。そこで各地から分離した好気性超好熱古細菌 *A. pernix* や、小笠原水曜海山の深海熱水孔から分離した好気性の *A. camini* を培養して、ヒドロゲナーゼ活性を検索し精製してその性状を解析した。その結果、*Aeropyrum* 属数株の可溶性画分からは 97kDa の本酵素活性が精製された。本菌から精製されたヒドロゲナーゼ活性は、これまで報告された本酵素の酸素耐性と比較した場合極めて酸素耐性が強く、強い耐熱性とともに入水素エネルギー触媒への大きな可能性を有していた。そこで現在水素生産系の開発研究を行っておりこれについて紹介したい。

また培養困難な微生物群についても、画期的な微生物単離法である光ピンセットを用いたレーザーマニピュレーションシステムを使った新規好熱菌の分離法が開発され始め、従来培養が困難と考えられてきた微生物の分離・培養が徐々に可能となってきている。一方で分子生物学や遺伝学的方法論が押し進められ、ある種の海産のカイメンと共生する培養できない古細菌に対して、カイメンを含む古細菌の天然試料から直接 DNA を抽出し、古細菌 DNA のみを増幅してその遺伝情報から微生物本体の生理機能や代謝的特徴を探るといった技術が確立された。これらの方法論の確立は、培養困難な未知微生物からの遺伝子資源の利用・開発を含めた環境ゲノム工学の可能性を切り開くものである。実際これらの研究の基本的概念は米国ベンチャー企業の環境ゲノム工学用のオートメーションロボットに取り入れられ、環境中の有用遺伝子資源の開発に利用されている。

さらにゲノム解析の新しいテクノロジーとして注目されている DNA チップを用いたゲノム遺伝子構造やその機能の解析を応用し、環境試料から直接抽出したヘテロな微生物群集の遺伝子構造や機能について解析する試みも行われつつある。こうした培養に依存しない遺伝子情報の解析は極めて多様な代謝、酵素活性、環境修復能を持った微生物群集に存在する無限の遺伝子資源の開発、利用にも役立つことが期待されている。

文献

- (1) 左子芳彦 海洋熱水環境における超好熱菌の役割 p.91-100, 「海の世界微生物学」(石田祐三郎・杉田治男編) 恒星社厚生閣 東京 (2005)
- (2) Sako, Y., N. Nomura, A. Uchida, Y. Ishida, H. Morii, Y. Koga, T. Hoaki and T. Maruyama.

- Aeropyrum pernix* gen nov., sp. nov., a novel aerobic hyperthermophilic archaeon growing at temperatures up to 100°C. Int. J. Syst. Bacteriol., 46 : 1070-1077 (1996)
- (3) Nakagawa, S., Takai, K., Horikoshi, K., and Sako, Y. *Aeropyrum camini* sp. nov., a strictly aerobic, hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent chimney. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 54 : 329-335 (2004).
 - (4) Nakagawa S, Takai K, Inagaki F, Hirayama H, Nunoura T, Horikoshi K and Sako Y.: Distribution, phylogenetic diversity and physiological characteristics of epsilon-*Proteobacteria* in a deep-sea hydrothermal field. Environ. Microbiol., 7: 1619-1632 (2005)
 - (5) Nakagawa S, Takai K, Inagaki F, Chiba H, Ishibashi J, Kataoka S, Hirayama H, Nunoura T, Horikoshi K and Sako Y. : Variability in microbial community and venting chemistry in a sediment-hosted backarc hydrothermal system: Impacts of seafloor phase separation. FEMS Microbiol. Ecol., 54: 141-155 (2005)
 - (6) Nakagawa S, Takai K, Inagaki F, Horikoshi K and Sako Y. : *Nitratiraptor tergaricus* gen. nov., sp. nov. and *Nitratifactor salsuginis* gen. nov., sp. nov., nitrate-reducing chemolithoautotrophs of the e-*Proteobacteria* isolated from a deep-sea hydrothermal system in the Mid-Okinawa Trough. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 55: 925-933 (2005)
 - (7) Nakagawa S, Inagaki F, Takai K, Horikoshi K and Sako Y. : *Thioreductor micantilosus* gen. nov., sp. nov., a novel mesophilic, sulfur-reducing chemolithoautotroph within the e-*Proteobacteria* isolated from hydrothermal sediments in the Mid-Okinawa Trough. Int. J. Syst. Eol. Microbiol., 55: 599-605 (2005)
 - (8) 中川 聡、左子 芳彦 : 深海熱水環境における極限環境微生物の分布・生息量・多様性・生理機能 日本微生物生態学会誌、20: 39-46 (2005)
 - (9) 野村紀通・左子芳彦 : 超好熱古細菌からの遺伝子資源の開発利用 月刊海洋号外 No.35, 168-175 (2003)
 - (10) Nomura, N., Y. Sako and A. Uchida. Molecular characterization and postsplicing fate of three introns within the single rRNA operon of the hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* K1. J. Bacteriol., 180 : 3635-3643 (1998)
 - (11) Nakayama, H., Morinaga, Y., Nomura, N., Nunoura, T., Sako, Y., and Uchida, A.: An archaeal homing endonuclease I-*PogI* cleaves at the insertion site of the neighboring intron, which has no nested open reading frame. FEBS Lett., 544(1-3), 165-170 (2003).
 - (12) Nomura N, Morinaga Y, Shirai N and Sako Y. : I-ApeI: a novel intron-encoded LAGLIDADG homing endonuclease from the archaeon, *Aeropyrum pernix* K1. Nucleic Acid Res., 33: e116 (2005)
 - (13) Nakayama H, Shimamura T, Imagawa T, Shirai N, Itoh T, Sako Y, Miyano M, Sakuraba H, Ohshima T, Nomura N, Tsuge H. Structure of a Hyperthermophilic Archaeal Homing Endonuclease, I-Tsp06II : Contribution of Cross-domain Polar Networks to Thermostability. J.Mol.Biol., (2007), 365(2):362-78.
 - (14) 西村宏・左子芳彦 バイオ水素 バイオプロセスによる水素生産 p.115-120, 「新エネルギー最前線」(環境調和型エネルギーシステムの構築を目指して) 吉川編 化学同人 京都 (2006)