

好アルカリ性細菌のアルカリ適応機構

藤浪 俊¹・守野 正人²・伊藤 政博^{1,3*}

好アルカリ性細菌は、多様な分布を示す極限環境微生物の一種であり、その中のいくつかはpH12以上の強アルカリ性環境でも生育することができる。好アルカリ性細菌は、バイオレメディエーションや産業応用に利用される酵素の生産菌としても注目されている^{1,2)}。そして、最近では特に“好アルカリ性”とさらに別の極限環境でも生育するような微生物（たとえば、好熱好アルカリ性細菌、好冷好アルカリ性細菌、好塩好アルカリ性細菌などのpolyextremophiles）からの有用酵素の分離例も報告されるようになった^{3,4)}。近年、好アルカリ性細菌のゲノム解析が増え続けているお蔭で、これらゲノム情報を利用した有用酵素の研究も進められている。さらに、タンパク質工学的手法を用いた耐アルカリ性酵素の改変技術も進歩している^{5,6)}。

今回は、さまざまな分野で利用されている好アルカリ性細菌の生理学的側面、すなわち好アルカリ性細菌のアルカリ適応機構に焦点を当て著者のグループの研究成果を中心に概説したい。

好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌の細胞表層がアルカリ適応に及ぼす影響

細胞壁の構造と役割 通性好アルカリ性細菌 *Bacillus halodurans* C-125株（以後、C-125株）や *Bacillus pseudofirmus*

firmus OF4株（以後、OF4株）の細胞壁をリゾチーム処理してプロトプラスト化すると、生育下限の中性環境では細胞壁を再生して生育することができるが、高アルカリ性環境では生育することができない⁷⁾。このことから、好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌のアルカリ適応には細胞壁が重要であることが示唆されている。

C-125株とOF4株の細胞壁の模式図を図1に示した。好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌のペプチドグリカン構造は、一般的な *Bacillus* 属細菌のものと同じA1 γ 型とよばれる構造を持っている。好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌の細胞壁の特徴は、高アルカリ性環境に適応するための二次的な細胞壁ポリマー（SCWPs）を持つことである⁸⁾。

このような二次細胞壁ポリマーとして、C-125株ではテイクロン酸の他、ウロン酸と酸性アミノ酸から構成されているテイクロノペプチドとよばれる酸性高分子が存在する。特にテイクロノペプチド欠損株は高アルカリ性環境での生育の悪化が見られる⁹⁾。

OF4株では、 γ -ポリグルタミン酸の他に細胞表層タンパク質 SlpA が存在する。この SlpA は酸性アミノ酸含量が高いという特徴があり、SlpA 欠損株は高アルカリ性 pH・低 Na⁺ 濃度環境での生育が悪化する¹⁰⁾。

C-125株とOF4株は比較的近縁であり、そのゲノムを比較すると、多くの共通点が見られるが、二次細胞壁

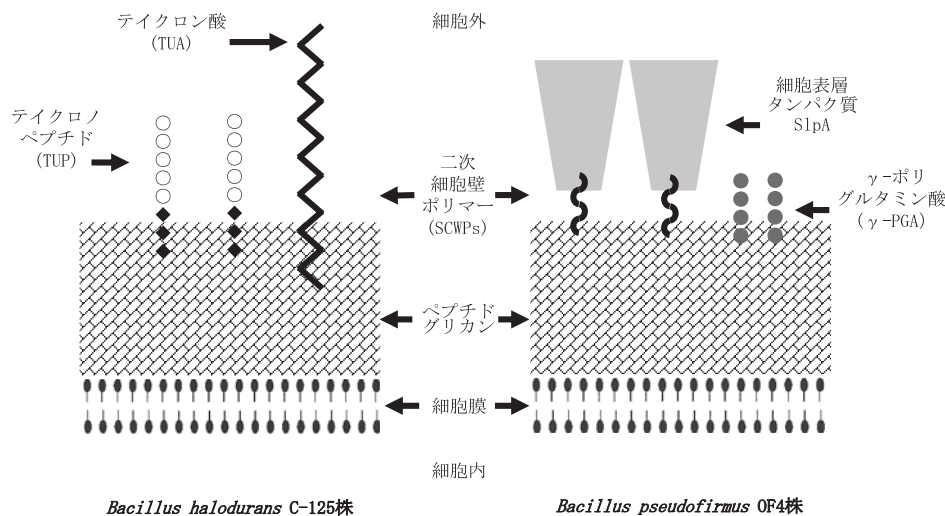


図1. 好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌の細胞壁の模式図

*著者紹介 東洋大学生命科学部生命科学科（教授）E-mail: masahiro.ito@toyo.jp

¹東洋大学バイオナノエレクトロニクス研究センター、²マウントサイナイ医科大学、³東洋大学生命科学部

ポリマーに関する遺伝子については多くの相違点が見られる¹¹⁾。しかし、どちらの二次細胞壁ポリマーも酸性アミノ酸などの酸性化合物を多く含んでおり、①細胞壁に存在する二次細胞壁ポリマーがもつ多量の陰荷電が、高アルカリ性環境下での菌の生育に有利に働くこと、②高アルカリ性環境に多量に存在するOH⁻の細胞内への流入に対して細胞壁中の二次細胞壁ポリマーが障壁の役割をしていることが示唆されている。

この他にも、好アルカリ性*Bacillus*属細菌の細胞壁や菌体外に存在するタンパク質は、酸性アミノ酸の含量が多く、その等電点(pI)が低い傾向にある¹¹⁾。好アルカリ性細菌にとって低pIのタンパク質を細胞表層にもつことは、Na⁺やH⁺を細胞表層近傍で引き付けるのに役立っている可能性が示唆されている。

二次細胞壁ポリマー含量の変化 生育下限の中性pHの培地で培養したC-125株の細胞を集菌し、高アルカリ性の培地に再懸濁させると多くの細胞が溶菌して死んでしまう。ところがOF4株の細胞で同様の実験を行うと、溶菌することなく生育することができる。これは二次細胞壁ポリマーの発現制御の違いによると考えられる。

C-125株のテイクロン酸やテイクロノペプチド含量は中性環境で生育させた場合よりも、高アルカリ性環境で生育させた場合のほうが2~4倍増加することが知られている⁹⁾。このため、中性環境で培養したC-125株は、細胞壁中のテイクロン酸やテイクロノペプチドの含量が低く、突然の高アルカリ性環境に適応できなかつたと推察される。

これに対してOF4株の細胞表層タンパク質SlpAは中性環境でも高アルカリ性環境と同様に発現している¹⁰⁾。このため、突然の高アルカリ性環境に対しても適応できたと推察される。

先ほども述べたように、OF4株のSlpA欠損株は高アルカリ性pH・低Na⁺濃度環境での生育が悪化することが知られているが、中性環境では野生株よりも良好な生育を示すことが報告されている¹⁰⁾。この理由として、野生株は、中性環境では不要なSlpAを常に高発現しており、余計なエネルギーを消費しているためと推察される。これは非効率に思えるが、突然、高アルカリ性環境に曝された場合には生存に有利に働くと考えられる。

遺伝子発現の制御 C-125株とOF4株の外環境pHに対する遺伝子発現制御の違いは、べん毛形成においても報告されている。

Na⁺駆動型べん毛モーターを持つ好アルカリ性*Bacillus*属細菌の運動性は、中性環境ではH⁺による競合阻害によって低下すると考えられており^{12,13)}、べん毛

は中性環境では無用の長物となってしまう。C-125株の細胞当たりのべん毛の本数はpH7ではゼロ本、pH8では4本程度なのに対し、pH10では平均21本と劇的に増加するが¹⁴⁾、OF4株は中性環境でも高アルカリ性環境でも細胞当たりのべん毛の本数は、1本程度と変化がなかった¹³⁾。このことからOF4株は、中性環境においても急激に高アルカリ性環境に移行した場合に備えていると考えられる。

C-125株は外環境pHに合わせて遺伝子発現を変化させる場合が多いのに対し、OF4株ではそれほど変化がないことはマイクロアレイや二次元電気泳動の結果からも示されており^{10,15)}、二つの好アルカリ性細菌の対アルカリ性環境適応戦略の違いが垣間見える。

好アルカリ性*Bacillus*属細菌の 高アルカリ性環境適応における細胞膜の機能的役割

好アルカリ性細菌は高アルカリ性環境下においても、その細胞質を中性から弱アルカリ性に維持している。OF4株の場合、外環境pHが10.5の場合、細胞内pHは8.3程度に維持されている。このように細胞内pHを外環境pHよりもpHユニットで2程度低く保つことは、細胞内のホメオスタシス(恒常性)に重要であると考えられている。また、一般に好アルカリ性細菌は、べん毛の回転や栄養の取り込みにナトリウム駆動力(細胞内外のNa⁺濃度差と膜電位差による電気化学的ポテンシャル差)を利用する。高アルカリ性環境下では細胞内がより酸性化されてプロトン駆動力形成に不利なために代替エネルギーとしてナトリウム駆動力に依存していると考えられている。そのため、高アルカリ性環境における細胞内酸性化やナトリウム駆動力の維持は、アルカリ適応の重要な機構の一つであるといえる。そこで、次に高アルカリ性環境における細胞内ホメオスタシスの主要な役割を担うNa⁺/H⁺アンチポーターについて紹介する。また、高アルカリ環境での酸化的リン酸化によるATP合成についても紹介する。

アルカリ環境適応におけるNa⁺/H⁺アンチポーターの役割 Na⁺/H⁺アンチポーターは、細胞内へのH⁺の再取込み経路の一つとして、また、細胞内へ流入するNa⁺の排出経路としても高アルカリ性環境適応に不可欠な膜内在性タンパク質として知られている(図2)。Na⁺/H⁺アンチポーターの交換輸送はプロトン駆動力に共役しており、大腸菌NhaAでは1Na⁺/2H⁺の交換比率で輸送が行われている¹⁶⁾。このように、より多くのH⁺を輸送することで、高アルカリ性環境下においても膜電位依存的にNa⁺を能動輸送することができると考えられている。

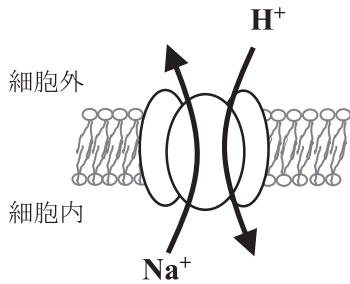


図2. Na⁺/H⁺アンチポーター. Na⁺/H⁺アンチポーターはプロトンの細胞内への取込みに共役して、ナトリウムイオンを排出する. Na⁺/H⁺アンチポート反応は、プロトン駆動力を消費することでナトリウムイオンを能動的に排出している.

またNa⁺/H⁺アンチポーターはどの生物種においても普遍的に存在するタンパク質であり、細胞内ホメオスタシスにとって重要な役割を担っている. 特に好アルカリ性*Bacillus*属細菌においては、Mrp (マープ, multiple resistance and pH adaptation) と呼ばれるNa⁺/H⁺アンチポーターが高アルカリ性環境適応において中心的な役割を担っている.

Mrpは、C-125株のアルカリ感受性変異株を相補する変異箇所として発見された¹⁷⁾. 一般にNa⁺/H⁺アンチポーターの多くは一遺伝子から発現され、単量体もしくはホモ二量体として機能しているものが多い. しかし、Mrpはオペロン構造をとる7つの遺伝子から発現され、そのNa⁺/H⁺アンチポート活性には、すべての遺伝子産物を必要とする. 発現されるタンパク質はすべて疎水性タンパク質であり、それら遺伝子産物は膜タンパク質複合体を形成している. Mrpは、好アルカリ性細菌に特異的というわけではなく広く真正細菌や古細菌にその相同タンパク質が存在する. それらホモログの*mrp*遺伝子クラスターの構造は多様性に富んでいる(図3). たとえば、*Bacillus*属細菌由来の*mrp*遺伝子クラスターなどは7つの遺伝子からなる. 一方でコレラ菌などの*mrp*遺伝子クラスターは、*mrpA*と*mrpB*が融合して一つの遺伝子として存在しているため、6つの遺伝子から構成されている. また、シアノバクテリアのMrpは、*mrpC*と*mrpD*遺伝子を2つずつ保持する特徴的な遺伝子クラスターから発現される. このように遺伝子構造が多岐にわたるMrpホモログも、基本的にはNa⁺/H⁺アンチポーターもしくはK⁺/H⁺アンチポーターとして機能し、それぞれの宿主細胞で高アルカリ性環境や高塩性環境への適応に主要な役割を果たしている.

好アルカリ性*Bacillus*属細菌における酸化的リン酸化の特徴 細胞内で消費される大半のATPの合成は、

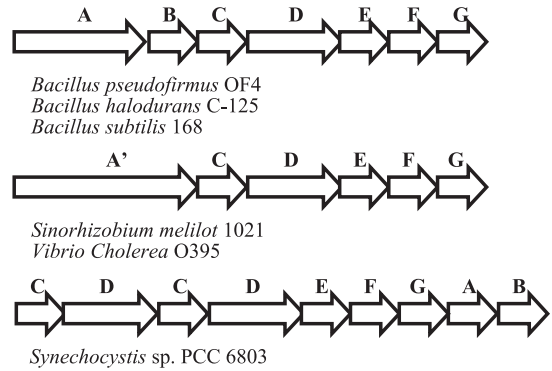


図3. *mrp* 遺伝子クラスターの多様性. *Bacillus*属細菌の*mrp* 遺伝子クラスターは7つの遺伝子からなるが、根粒菌やコレラ菌などの*mrp* 遺伝子クラスターは6つの遺伝子からなる(*mrpA*と*mrpB*に相当する遺伝子が融合している). シアノバクテリア*mrp* 遺伝子クラスターでは、遺伝子の重複が見られる.

呼吸鎖により形成されるプロトン駆動力を利用してATP合成酵素が行う. 通常、このような細胞膜上で行われる一連の酸化的リン酸化は、プロトン駆動力に共役して行われるが、嫌気性好アルカリ性細菌のようにナトリウム駆動力を利用してATP合成を行う例も発見されている. 一方で、OF4株やC-125株のような好気性好アルカリ性*Bacillus*属細菌は、べん毛の回転や栄養の取り込みにナトリウム駆動力を利用しているが、酸化的リン酸化によるATP合成にはプロトン駆動力を利用している. 高アルカリ性環境は、プロトン駆動力を利用しづらいので好アルカリ性*Bacillus*属細菌はこのような環境において効率よくATP合成を行う機構を兼ね備えていると考えられている.

好気性好アルカリ性*Bacillus*属細菌のF₀F₁-ATP合成酵素やプロトンポンプとして機能する呼吸鎖複合体の*caa*₃型シトクロム酸化酵素のサブユニットは、アミノ酸配列のマルチアライメント解析により好アルカリ性細菌特有のモチーフを持つことが明らかとなっている. OF4株のF₀F₁-ATP合成酵素において、この好アルカリ性細菌に特有のモチーフに好中性細菌のものと同じアミノ酸置換変異を導入することで、高アルカリ性環境での生育低下やATP合成能の低下が引き起こされることが報告されている¹⁸⁾. また中性環境よりも高アルカリ性環境で生育させた好アルカリ性*Bacillus*属細菌の細胞膜には電子伝達系の成分であるシトクロムが通常の数倍存在する. また、pH10.5で培養したOF4株では、*caa*₃型シトクロム酸化酵素がF₀F₁-ATP合成酵素よりも4倍量も過剰に発現している. 反対にpH7.5で培養したOF4株では、1.6倍しか発現量に差がない. このことから、電子伝達

によって排出される H^+ は、細胞外液と平衡にならず、細胞膜内で直接 F_0F_1 -ATP合成酵素に渡して利用されればATP合成は可能と考えられている。Krulwichらによりこの細胞膜内を介した局所的 H^+ の循環によるエネルギー共役説が提唱されているが、いまだに証明はされていない。現在までに、飽和移動電子スピン共鳴法や示差走査熱量測定法といった手法を用いて試験管内で caa_3 型シトクロム酸化酵素と F_0F_1 -ATP合成酵素が共局在していることが報告されている¹⁹⁾。しかし、実際の細胞内での共局在に関する直接的な証拠は得られていない。

ミトコンドリア呼吸鎖では、呼吸鎖複合体や F_0F_1 -ATP合成酵素が超複合体を形成して効率的なプロトン駆動力の利用を図っていることが示唆されている²⁰⁾。好アルカリ性細菌においても小さなプロトン駆動力しか得られない高アルカリ性環境でエネルギー共役に関わる膜タンパク質間の距離を近接させることで、呼吸鎖から排出されたプロトンが外環境の OH^- との中和に利用されるのではなく、直接的にATP合成酵素にプロトンを受け渡すことによって、より効率的にATP合成を行っている可能性が示唆される。今後、この問題の解明が待たれる。

好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌の細胞膜表層 好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌の細胞膜は、好中性細菌と比べて、非常に多くのアニオン性脂質（主にカルジオリピン）を含有している。このようなマイナス荷電を帯びた脂質は、先述した細胞壁の酸性化合物と同様に細胞表層近傍での Na^+ や H^+ などの保持に関与し、効率的なエネルギー共役に加担していると考えられている。

おわりに

近年の好アルカリ性細菌に関する研究の発展は、その多様性やゲノム解読のお蔭で、より急速に進んでいる。一昔前は、好アルカリ性細菌由来の応用研究は、その菌が生産する酵素の利用に関するものがほとんどであった。しかし、今後は、バイオリアクターや環境浄化、更には新分野での好アルカリ性細菌を利用した応用研究がさらに進み、さらなる研究領域が立ち上がることが予想される。10年後、20年後にそれらの成果をまとめて紹介できる日が来ることを楽しみにしている。

文 献

- 1) Fujinami, S. and Fujisawa, M.: *Environ. Technol.*, **31**, 845 (2010).
- 2) Sarethy, I. P. et al.: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 769 (2011).
- 3) Yumoto, I. et al.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, 2379 (2004).
- 4) Mesbah, N. M. and Wiegel, J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1125**, 44 (2008).
- 5) Shirai, T. et al.: *J. Mol. Biol.*, **310**, 1079 (2001).
- 6) Shirai, T. et al.: *Proteins*, **66**, 600 (2007).
- 7) Aono, R. et al.: *Biochem. J.*, **285**, 99 (1992).
- 8) Aono, R. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 1083 (1983).
- 9) Aono, R. et al.: *Microbiology*, **141**, 2955 (1995).
- 10) Gilmour, R. et al.: *J. Bacteriol.*, **182**, 5969 (2000).
- 11) Janto, B. et al.: *Environ Microbiol.*, **13**, 3289 (2011).
- 12) Fujinami, S. et al.: *Arch. Microbiol.*, **187**, 239 (2007).
- 13) Fujinami, S. et al.: *Future Microbiol.*, **4**, 1137 (2009).
- 14) Aono, R. et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**, 48 (1992).
- 15) JAMSTEC: Annual report 2002, p.76 (2003).
- 16) Taglicht, D. et al.: *J. Biol. Chem.*, **268**, 5382 (1993).
- 17) Kudo, T. et al.: *J. Bacteriol.*, **172**, 7282 (1990).
- 18) Hicks, D. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **1797**, 1362 (2010).
- 19) Liu, X. et al.: *Biochemistry*, **46**, 306 (2007).
- 20) Genova, M. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **1777**, 740 (2008).