

好熱菌研究のいま：高温適応から低温適応へ

藤原 伸介^{1,2*}・高 楽¹

好熱菌は古くから産業用酵素の生産菌として用いられてきた。特にアミラーゼやプロテアーゼといった加水分解酵素は原材料の加工用酵素として現在も活躍している。その一方で、好熱菌は生命進化を考える上できわめて興味深い位置づけにいる。特に80°Cを越える温度で活発に生育する超好熱菌は、原始生命にもっとも近い現存生物として研究者を惹きつけている。この章ではこれまでの蓄積された好熱菌研究の歴史をふり振り返りつつ、最新の知見を加え、生物進化における多様性獲得のプロセスについても考えてみたい。

好熱菌の系統的位置づけ

好熱菌 (thermophiles) は55°C以上で生育可能な微生物の総称である。65°Cでも生育可能なものを中等度好熱菌 (moderate thermophiles)、75°C以上で生育できるものを高度好熱菌 (extreme thermophiles) という。この分類方法に従えば、堆肥などから分離される *Bacillus stearothermophilus* は中等度好熱菌、好熱菌研究の中心的細菌である *Thermus thermophilus* は高度好熱菌に分類される。これらに対し、80°C以上でも生育できる微生物が超好熱菌 (hyperthermophiles) である。超好熱菌の多くは嫌気性であるが、その一方で *Sulfolobus* 属、*Pyrobaculum* 属など好気性の超好熱菌も分離されている。

近年、分子生物学の進歩に伴い、生物間の進化を遺伝子の変異履歴に基づいて数理統計学的に解析する技術 (分子進化学) が確立された。系統解析にもっとも広く利用されているのは16SリボソームRNA (16S rRNA) の配列やリボソームRNA間の配列 (ribosomal intergenic spacer region, 一般的に16SrRNA-23SrRNA間の配列) である。これらは多くの構造遺伝子と異なり進化の過程で生じた塩基置換を蓄積している。1977年から1990年にかけて米国イリノイ大学のWoeseらの研究グループを中心に世界中の分子系統科学者が生物の系統分類を行った。彼らの研究により、原核細胞でありながら系統的に他の細菌と区別されるグループの存在が示された。この新しい生物群にはメタン生成菌の他に高温、高塩、あるいは強酸といった極限環境に生育する微生物が属し、生理的、生化学的にも他の細菌群とは区別された。Woeseはこの新しい細菌群を古細菌 (archaeobacteria)

と命名し、従来の細菌群を真正細菌 (eubacteria) とした¹⁾。その後、数多くの遺伝子の塩基配列やタンパク質のアミノ酸配列が明らかになるにつれ、古細菌は真正細菌とはまったくの遠縁で真核生物に近いことが明らかになった。Woeseはここにきて全ての生物を3つの分類単位に分けることを提唱した²⁾。この3つの単位がDomain Eucarya (ユーカリア)、Domain Bacteria (バクテリア)、そしてDomain Archaea (アーキア) である。アーキアは形態的には原核生物に属することから、新しいドメインとして独立させることについて批判も多くあった。しかし、国際的にはアーキア概念が受け入れられつつある。現在、Archaeobacteriaという慣用名は、国際的には用いられていない。我が国ではArchaeaに属する微生物を『始原菌』と表現することがある³⁾。アーキアにはメタン菌 (methanogens)、高度好塩菌 (halophiles)、そして超好熱菌 (hyperthermophiles) が含まれる。3つのDomain、および3つのArchaeaの関係を図1に示す。

メタン菌と呼ばれる微生物は厳密にはメタン生成菌を指す。生物代謝にメタンを利用する微生物は2種類あり、ひとつは好気環境下でメタンを酸化してメタノールを生成するメタン酸化細菌であり、もうひとつは嫌気環境下でメタンを生産するメタン生成菌である。両者はしばしば混同して扱われることがあるが、前者はバクテリアであり、後者はアーキアである。メタン生成菌は嫌気性でグラム陽性・陰性の両方が存在し、湖沼の底の堆積物や水田あるいは、シロアリ後腸に共生して棲息している。

好塩菌は塩田や塩湖に生育し、生育に高濃度の食塩 (NaCl) を要求する。既知の好塩菌はすべて生育に高濃度のNaClを要求し、高濃度のKClでは生育できない。多くの種が低酸素分圧下で光照射を受けるとバクテリオロドプシンを含む紫膜を合成する。

超好熱菌は80°Cから115°Cの範囲で生育する微生物群であり、2種の細菌 (*Thermotoga maritima*, *Aquifex pyrophilus*) を除き、すべてアーキアである。温泉や海底の熱水噴出口、硫気孔から分離されている。超好熱菌は例外なく系統樹の根に近いところに現れる。このことは生命が高温環境下で誕生したことを強く示唆するものである。またアーキアはユーカリアと同じ枝から分岐しており、系統分類上、両者の近縁性は高い。つまりアー

*著者紹介 ¹関西学院大学大学院理工学研究科生命科学専攻 (教授) E-mail: fujiwara-s@kwansei.ac.jp

²生物機能基材研究開発センター

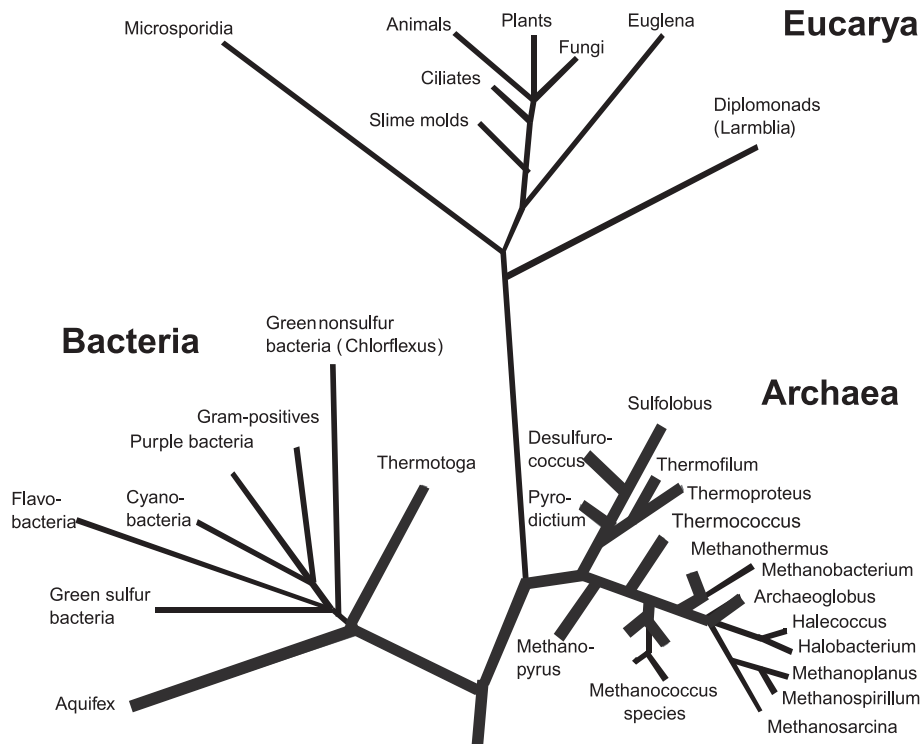


図1. 生物進化における各ドメインの位置づけ. 文献2)を一部改変. 太線は超好熱菌を示す. 生物起源は好熱性であったことを示唆している.

キアの中の超好熱菌は真核生物の起源にもっとも近い原核生物と位置づけることができる。一方、バクテリアの中の超好熱菌は細菌の起源にもっとも近い原核生物と位置づけることができる。両者はいずれも80°C以上で生育する超好熱菌であるが、生物進化の履歴は異なる。実際、アミノ酸配列の特徴を比較すると、超好熱性バクテリアは例外なく大腸菌など細菌と同じ特徴を示すのに対し、超好熱アーキアはRNAポリメラーゼなど真核生物とよく似た特徴を示す。

好熱菌の高温適応機構

好熱菌がなぜ高い温度で生育できるかについては、これまでに多くの研究が行われた。タンパク質でいえば内部疎水度の高さ、分子表面に存在する荷電性アミノ酸による静電相互作用などは、きわめて一般性の高い耐熱化戦略であろう。

核酸の安定化については長鎖分岐型ポリアミン分子やヒストン様タンパク質が関与しているといわれている。特に長鎖分岐型ポリアミンの生合成系が破壊された超好熱菌は生育温度が著しく低下することから、高温での生育における重要性が指摘されている⁴⁾。長鎖分岐型ポリアミンはtRNAに作用し、高温での安定性維持に関与し

ている。

一方、過去に通説になっていたゲノム中のGC含量などは高温での安定化にはそれほど重要ではない。超好熱菌のGC含量は必ずしも高くなく、わずか38%のGC含量で80°C以上の高温で生育する好熱菌もいる。最近、高温でのゲノム安定化の要因として超らせん構造の維持が注目されるようになった。正の超らせん構造を導入する酵素がリバーシジャイレースである。生命誕生のストーリーでは、高温で誕生した原始生命は、まずユーカリア/アーキアの起源とバクテリアの起源に分岐したと考えられている(図1参照)。もし共通の祖先が存在するとすれば、現存する好熱性のアーキアと好熱性のバクテリアで共通の遺伝子が存在しても不思議ではない。リバーシジャイレースはヘリカーゼとトポイソメラーゼのドメインを有し、アーキアとバクテリアの超好熱菌に共通して存在する唯一の酵素である⁵⁾。60°Cから95°Cで生育する超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* において遺伝子破壊技術を用いてリバーシジャイレースの破壊が試みられた⁶⁾。リバーシジャイレース遺伝子が破壊された超好熱菌は、生育上限温度が下がり、高温での生育が顕著に衰えた。ただ本破壊株は85°Cでも生育し、依然超好熱菌であった。リバーシジャイレースが生命進化の

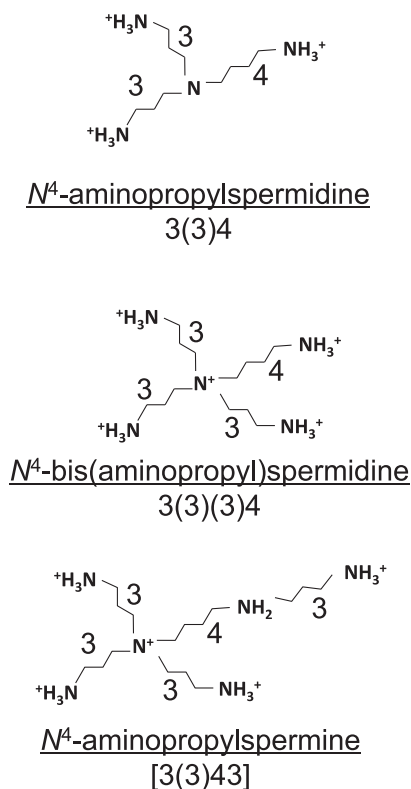


図2. 好熱菌に存在する長鎖分岐型ポリアミン

過程で果たした役割は大きいと予想されるが、核酸の安定化には複数の要因があったことは間違いない。

アーキアの膜脂質研究から、高温での安定性に脂質成分が重要な役割を果たすことが解明されている。これまでにアーキアの膜脂質に関して明らかになっていることは、次の4点である⁷⁾。(1)炭化水素鎖とグリセロールの結合はエーテル結合のみからなり、エステル結合は存在しない。(2)炭化水素鎖はイソプレノイドのみからなり、脂肪酸は存在しない。(3)グリセロール骨格の立体構造はアーキア以外の脂質とは対掌体となる *sn*-グリセロール-1-リン酸型である。(4)ジエーテル型脂質が、2分子向き合ってイソプレノイド炭化水素鎖どうして結合したテトラエーテル型脂質が存在し、両者はアーケオール型 (C₂₀)、カルドアーケオール型 (C₄₀) として区別されている (図2)。

アーケオール型 (C₂₀) (ジエーテル型脂質) では2個の炭素数20のフィタニル基、カルドアーケオール型 (C₄₀) (テトラエーテル型脂質) では2個の炭素数40のビフィタニル基がグリセロールの *sn*-2位と3位にエーテル結合している。Xにはセリン、エタノールアミン、イノシトール、グリセロールなどの極性基が、Yには糖鎖が結合する。

培養温度を上昇させたとき、および定常期に入ったときに膜脂質はC₄₀の割合が増加し、また、逆に低温側で培養したときおよびに対数増殖期ではC₂₀の割合が増加する⁸⁾。C₄₀は細胞膜を貫いた状態で存在し、単層膜を形成する。単層膜は二重膜に比べ、その構造上流動性が低下する。C₂₀とC₄₀の流動性の違いを考慮に入れると、低温ではC₂₀の増加による流動性を維持し、高温ではC₄₀の増加により流動性の抑制や膜の安定性を確保していると考えられる。対数増殖期では細胞分裂が活発に起こる。1つの細胞が2つに分裂するとき、膜は部分的に二重膜から一重膜になる必要があり、その状況に応じて変動が生じていると思われる。

好熱菌の低温適応機構

先に超好熱菌の耐熱化戦略について触れたが、生命進化の謎解きをするならば、低温への適応化戦略を調べるの方が近道かもしれない。これまでに多くの微生物でゲノム解析が行われてきたが、生育温度が下がるにつれて、ゲノムは大きくなる傾向がある。たとえば超好熱菌の多くは2 Mbp程度のゲノムしか持たないが、これは大腸菌や枯草菌の半分にも満たない。好熱性の原始生命はより低い温度で生育するために、遺伝子を増やし、多様性を獲得していったと思われる。実際、同属あるいは同日間で比較ゲノム解析を行ってみると、生育温度の低い種にはパラログが多い。Thermococcales目には *Pyrococcus* 属と *Thermococcus* 属というきわめて性質のよく似た2種が存在し、両者とも85°Cから95°Cで活発に増殖する。ただし前者は80°C以下の温度では生育しないが、後者は60°Cでも生育する。興味深いことに、後者には前者には存在しない低温誘導型遺伝子が多数見つかっており、これらは前者のゲノムには存在しない。この中には60°Cで発現する低温誘導型のRNAヘリカーゼ⁹⁾や低温誘導型の分子シャペロニン¹⁰⁾などが含まれる。これらの遺伝子は低温ストレス下での生存に密接にかかわっている。*Thermococcus kodakarensis*の低温で誘導される分子シャペロニンが破壊された変異株は低温ストレス下での生育が著しく衰えた¹⁰⁾。超好熱菌が低い温度で生育するには酵素の低温変性を防ぐ必要がある。もしかすると低温で誘導されるシャペロニンが捕らえているタンパク質集団は高温で誘導されるシャペロニンが捕らえるものとは異なるのかもしれない。実際に低温誘導型シャペロニン (CpkA) が補足したタンパク質を網羅的に解析すると、高温誘導型シャペロニン (CpkB) が補足したタンパク質とは構造的特徴が異なっていた¹¹⁾。図3にはそれぞれのシャペロニンが捕らえていたタンパ

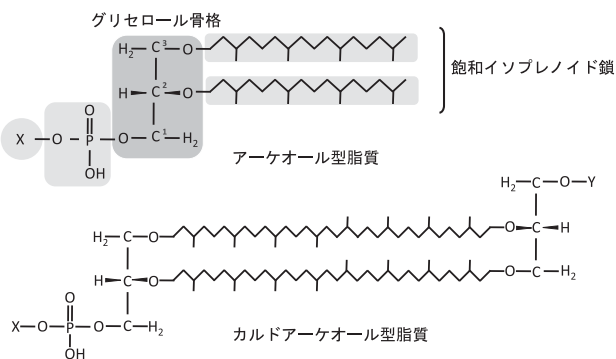


図3. アーキア脂質骨格の構造的特徴

ク質集団の特徴を模式的にまとめている。

CpkAとCpkBはアミノ酸配列の同一性が高く(77%),カルボキシル末端側の約30アミノ酸に顕著な違いがみられる。それぞれのシャペロニンで補足されたタンパク質は20~50kの分子量で、分子量分布には顕著な差は認められない(図4)。いずれのシャペロニンでも80k以上の分子の捕捉は少なかった。一方、等電点分布を比較すると、CpkBはCpkAよりも塩基性の高い分子を多く捕捉していた。実際リボソームタンパク質など塩基性の高いタンパク質分子は、そのほとんどがCpkBにより捕捉されていた。疎水度で比較するとCpkBが捕捉したタンパク質はCpkAが捕捉したタンパク質よりも疎水度が高い傾向がみられた。次に捕捉された分子を構造単位

で比較すると両シャペロニンは標的とする分子が異なることが示された。c.37群(P-loop nucleoside triphosphate hydrolase構造)は両方のシャペロニンで捕捉されたが、このグループは大腸菌のGroELでも多く捕捉されている。一方c.1群(TIM beta/alpha barrel), c.2群(NAD(P)-binding Rossmann-fold domains)はCpkAでのみ捕捉されていた。この結果から両シャペロニンの標的の認識機構には違いがあることがわかる。CpkAに特異的な標的タンパク質のうち、TK0252(Tk-TrpC)に注目して、試験管内でのリフォールディング実験が試みられ、それぞれのシャペロニンの添加効果が調べられた¹¹⁾。Tk-TrpCは低温誘導型シャペロニンCpkAによってのみリフォールディングが促進され、高温誘導型のCpkBの作用を受けなかった。この結果は低温誘導型シャペロニンを獲得した超好熱菌のみが、低温ストレス下でトリプトファン合成を可能にし、生き残っていったことを暗示している。

超好熱菌は低温環境に適応するために高温誘導型シャペロニンとは異なる低温誘導型のシャペロニンをパラログとして派生させ、低温変性しやすいタンパク質分子集団(酵素)の機能回復をはかりつつ生き残ったのであろう。構造のゆらいだ酵素分子は基質特異性を曖昧にしながら結果として多様性を獲得していったに違いない。実際、シャペロニンの高発現は酵素の基質特異性を改変させるという興味深い実験結果も報告されている¹²⁾。

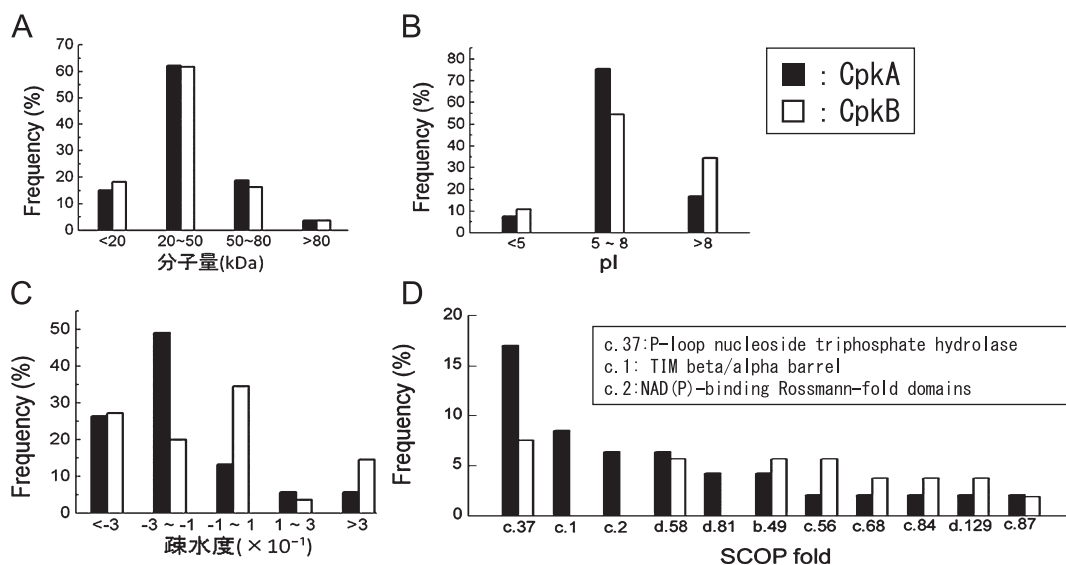


図4. 低温及び高温誘導型シャペロニンが補足したタンパク質の特徴。抗Cpk抗体を用いたプルダウン実験により分離されたタンパク質を分子量(A)、等電点(B)、疎水度(C)、構造分類(SCOP fold)(D)で分類した。黒塗り、白塗りはそれぞれCpkA、CpkBに補足されたタンパク質の割合を示す。

生物工学における好熱菌の重要性

好熱菌の生産する酵素は耐熱性がある。耐熱性酵素の利用でもっとも有名な例はPCR反応であろう。PCR反応以外にも、耐熱性酵素を利用すると反応プロセスを効率化する上でメリットがある。本学会の方には釈迦に説法かもしれないが、耐熱性酵素の持つ利点についていくつか触れておきたい。第一に、反応温度が高いため、雑菌の繁殖を抑えることができることである。第二に高濃度反応系の実現である。一般的に基質の溶解度は温度に比例するが、高温にすると高濃度で基質を溶解する（高濃度仕込み）ことが可能となる。これは生産コストを下げるほか、精製コストの低減にも繋がるため結果として生産性を向上させる。糖質産業では高濃度仕込みが行われるのはそのためである。高温で反応させると加熱コストがかかることを懸念する考え方があるが、これは間違いである。多くの工場では余剰熱を有しており、冷媒や冷却水で冷やしている。余熱を利用して反応器を稼働させることはトータルで省エネルギーになる。

耐熱性酵素のもつ、もうひとつの利点は変性環境下における安定性である¹³⁾。従来の酵素が変性する環境下でも耐熱性酵素は変性しにくい。この性質を利用して新しい酵素の利用技術が開発されている。加水分解酵素は水を使いながら分解反応を行うが、酵素反応は平衡論的に進むため、水分子が制限されると逆反応に向かう。すなわち理論上、酵素の逆反応は可能である。しかし残念ながら一般的にタンパク質は水分子が周りを取り囲んで水和しており、水分子が除かれると構造が維持されない。ところが耐熱性酵素は変性速度が遅く、変性環境下でも構造を保つ。アルコールや有機溶媒を入れると耐熱性酵素は変性することなく逆反応を行う。耐熱性アミラーゼを用いてブドウ糖に側鎖をつける技術（配糖化）や耐熱性プロテアーゼを利用したアミド化も効率よく行うことができる¹⁴⁾。

好熱菌研究のこれから

2年毎に、好熱菌に関する国際会議（Thermophiles）が開催されている。会を追ごとに参加者は増え、世界中から新しい研究者が集う。生命学者にとって、最大の関心事は生命がいかにして誕生したかを知ることであろう。現在、我々は原始生命体をみることはできないが、

それにもっとも近いとされる好熱菌は、多くの種で純粋培養が成功しており進化を考えるための魅力的なモデル生物である。好熱菌がいまなお多くの研究者を惹きつけて止まない理由はここにある。超好熱菌で遺伝子の破壊、機能の相補系が確立され、いわゆる遺伝学的実験手法が可能になってから約10年が経とうとしている。それまで機能未知であった遺伝子の機能が明らかにされ、原生的な代謝経路も明らかにされてきている。超好熱菌はATPだけでなく、ADPやピロリン酸をも有効利用し、エネルギーを得ているが、原始生命の代謝とはこれに近いものだったに違いない。これからの10年はオミックス研究の手法が活発に取り入れられ、さらに深い考察がなされるものと期待される。最近の分子系統解析の研究では、生命の共通の起源（Last Universal Common Ancestor, LUCA）は、58–78°Cあたりの温度で誕生し、まずアーキアとバクテリアの祖先に分かれ、より高温環境に適応した後に低い温度での生育に適応したとする学説もある¹⁵⁾。いずれにおいても低温適応は多様性獲得のための重要なプロセスであったに違いない。生命の誕生は、すべての生命学者がもっとも興味をもつ自然現象だが、いまだに実験で証明できない謎である。

文 献

- 1) Woese, C. R. and Fox, G. E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5088 (1977).
- 2) Woese, C. R. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4576 (1990).
- 3) 今中忠行: 生化学, **68**, 1730 (1996).
- 4) Morimoto, M. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **192**, 4991 (2010).
- 5) Forterre, P. *et al.*: *Trends Genet.*, **18**, 236 (2002).
- 6) Atomi, H. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **186**, 4829 (2004).
- 7) Koga, Y. and Morii, H.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **71**, 97 (2007).
- 8) Matsuno, Y. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 104 (2008).
- 9) Shimada, Y. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **389**, 622 (2009).
- 10) Fujiwara, S. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 7306 (2008).
- 11) Gao, L. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 3806 (2012).
- 12) Tokuriki, N. and Tawfic, D. S.: *Nature*, **459**, 668 (2009).
- 13) Fujiwara, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **94**, 518 (2002).
- 14) 藤原伸介ら: 現代化学9月号, p.14, 東京化学同人 (2002).
- 15) Groussin, M. and Gouy, M.: *Mol. Biol. Evol.*, **28**, 2661 (2011).