

進化する 食品高圧 加工技術

別刷り

—基礎から最新の応用事例まで—

第1編 基礎編

第2章 生体物質および生物への高圧力の影響とその作用メカニズム

第4節 深海微生物の圧力耐性機構

独立行政法人海洋研究開発機構 加藤 千明

「進化する食品高圧加工技術—基礎から最新の応用事例まで—」(2013年6月10日 株式会社エヌ・ティー・エス 刊)

第4節

深海微生物の圧力耐性機構

独立行政法人海洋研究開発機構 加藤 千明

1 はじめに

深海世界は、暗黒・低温・高圧下の極限環境世界である。19世紀ぐらいまでは、こうした深海世界は砂漠のような世界で、生物はほとんど存在しないであろうと考えられてきた。しかしながら、19世紀末に行われた研究航海による深海調査で、ドレッジ法（船で底引き網を引くようなサンプリング法）により得られたサンプルから、水深5,000 mを超える深海底にも、多くの変わった生物が存在するということが明らかとなった¹⁾。こうした流れを受け、前世紀の中頃にアメリカの海洋微生物学者、Zobel教授らにより、深海にはその高水圧下に適応して生息する微生物が存在するに違いないと提唱されるに至り、深海高水圧環境に適応した微生物を好圧性微生物（圧力を好む微生物。当時は *barophilic microorganisms* と呼ばれた、今日では *piezophilic microorganisms* と訂正されている）と定義され、彼らを中心に、大気圧下より高圧下でよく生育する微生物の探索が行われたのである^{2,3)}。そして、好圧菌の提唱から約30年後の1979年に、深海探査システムに使う装置や機械、サンプリング方法等の発展・改良にともない、ようやく深海底から初めて好圧性微生物が分離されたのであった⁴⁾。その後1981年には、大気圧では全く生育できない絶対好圧菌が分離され⁵⁾、深海底には、その深度に応じて、広く好圧性微生物が分布していることが推定されたのである。図1に微生物の生息と圧力の関係で好圧菌が定義されていることを示した。

筆者らは、1996年に世界最深水域である、マリアナ海溝チャレンジャー海淵（深度、約11,000 m）に大深度無人潜水調査船「かいこう」にて、潜航を行い、深度10,900 mから無菌的に深海底泥をサンプリングすることに成功した（図2(a), (b))。「かいこう」から送られてくる画像を見ていると、マリアナ海溝の底には多くの底生生物が生息しており、ナマコや深海エビ等が多く観察された。しかしながら、1960年にフランスの冒険家、ジャック・ピカールが「トリエステ号」にてマリアナ海溝に潜航⁶⁾した際、視認されたとする“深海魚”を確認することはできなかった。その後の「かいこう」による複数回の潜航においても、魚類を観察することはなく、

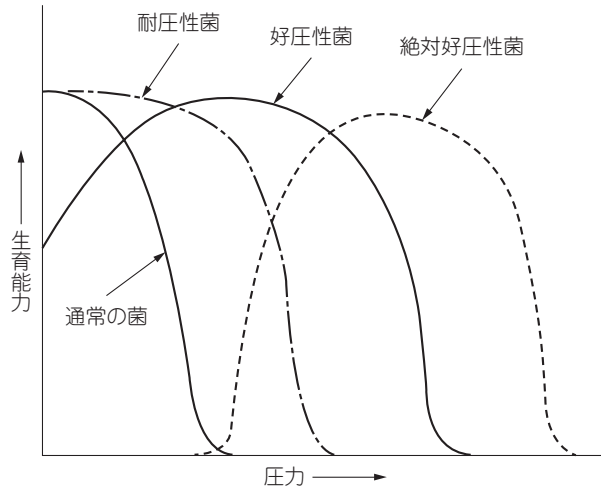


図1 微生物の増殖と水圧の関係の模式図

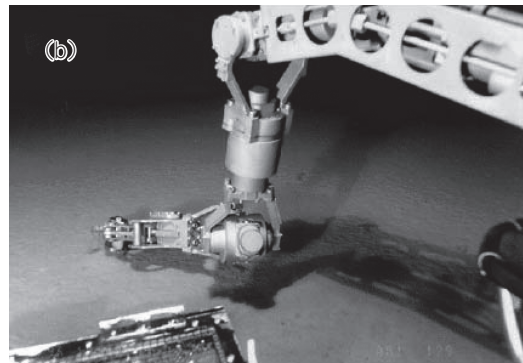
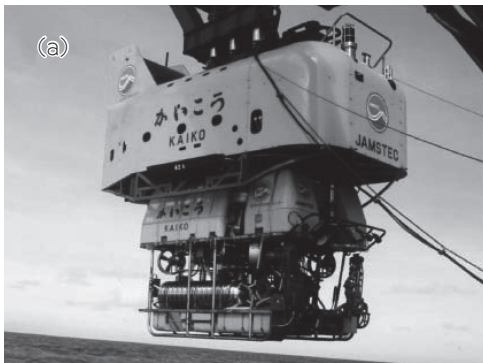


図2 (a) 大深度無人潜水調査船 ROV「かいこう」のマリアナ海溝海域での潜航写真, (b) マリアナ海溝底にて無菌採泥器による底泥のサンプリング模様, (c) マリアナ海溝底で観察された魚様のナマコ

これは脊椎動物の骨を形成する物質（リン酸カルシウム）が、水圧と塩分濃度の関係でこうした極限環境では安定に存在し得ないことが考えられ、彼らは魚類に似た形のナマコを見間違えたのではないかとされている。事実私どもの潜航でもそうした一見魚の形をしたナマコ類を多く観察している（図2(c)）。いずれにせよ、こうした超深海底には、1,000気圧の環境に適応した生き物で満ちているということが理解された。事実、本行動で得られたマリアナ底泥サンプルから2種の絶対好圧菌が分離され、分離された微生物は、500気圧（50 MPa）以下の圧力では全く生育できず、70～80 MPaにその生育至適があるということが明らかとなったのである⁷⁾。

そして、2012年には、「タイタニック」とか「アバター」などの大ヒット作で知られ、高名な映画監督であるジェームズ・キャメロンが、自作した有人潜水艇でマリアナ海溝チャレンジャー海淵を潜航したというニュースが報道された（http://www.nationalgeographic.co.jp/news/news_article.php?file_id=20120309001）。この航海には、アメリカの深海生物・微生物学者らも乗船していて、マリアナ海溝サンプルをシェアしているので、映像だけではなく科学的にもこの世界最深水域の状況がますます明らかになっていくであろう。本稿では、これまでの深海好圧性微生物の研究の現状を概観しその分類・生態について解説する。次に、こうした高圧環境に適応した微生物が持つ遺伝子発現の加圧応答のメカニズムや、タンパク質の特徴などについて、筆者らの研究室で実施された研究成果を中心に記述した。

2 好圧性微生物の分類学とその生態

筆者らが、深海微生物研究プロジェクト（DEEPSTAR計画、海洋科学技術センター、現独立行政法人海洋研究開発機構）を開始した1990年当時には、Demingらにより2種の好圧性微生物が分類・報告されていた⁸⁻¹⁰⁾。それは、*Shewanella benthica*と*Colwellia hadaliensis*である。しかしながら、これらの菌株の保存方法に問題があり、後者の*C. hadaliensis*は、筆者らが研究を開始した時点では菌株保存機関から失われていた。後にわかったことであるが、こういった深海由来の好圧菌は保存方法が難しく、通常の微生物の保管法（凍結乾燥や凍結保存）では復活再生が極めて困難であった。唯一、液体窒素（-180℃以下）での瞬間凍結法による保存でのみ長期にわたる保管が可能であった。

こうした技術的な課題点を克服しながら、DEEPSTAR計画では、深海高水圧環境に適応した微生物の多様性を明らかにするために、有人潜水調査船「しんかい6500」（最大潜航深度6,500 m）や無人潜水探査船「かいこう」（最大潜航深度11,000 m）などを用いて、深度5,000 mを超える深海底に潜航して底泥サンプルを回収した。得られたサンプルは、現場水圧・温度条件で培養され好圧菌分離のためのソースとされた。好圧菌の分離法に関しては、Katoの総説を参照されたい¹¹⁾。

今日までに低温環境に適応している好圧性微生物は、5属11種報告されている。16SリボゾームRNA遺伝子の塩基配列に基づく系統樹を図3に示した。分離された好圧菌は、いずれも大腸菌などとも近縁なガンマプロテオバクテリアグループに属し*Shewanella*, *Photobacterium*, *Colwellia*, *Moritella*, *Psychromonas*属の5属に分布している。以下にそれぞれの属・種の特徴について解説する。

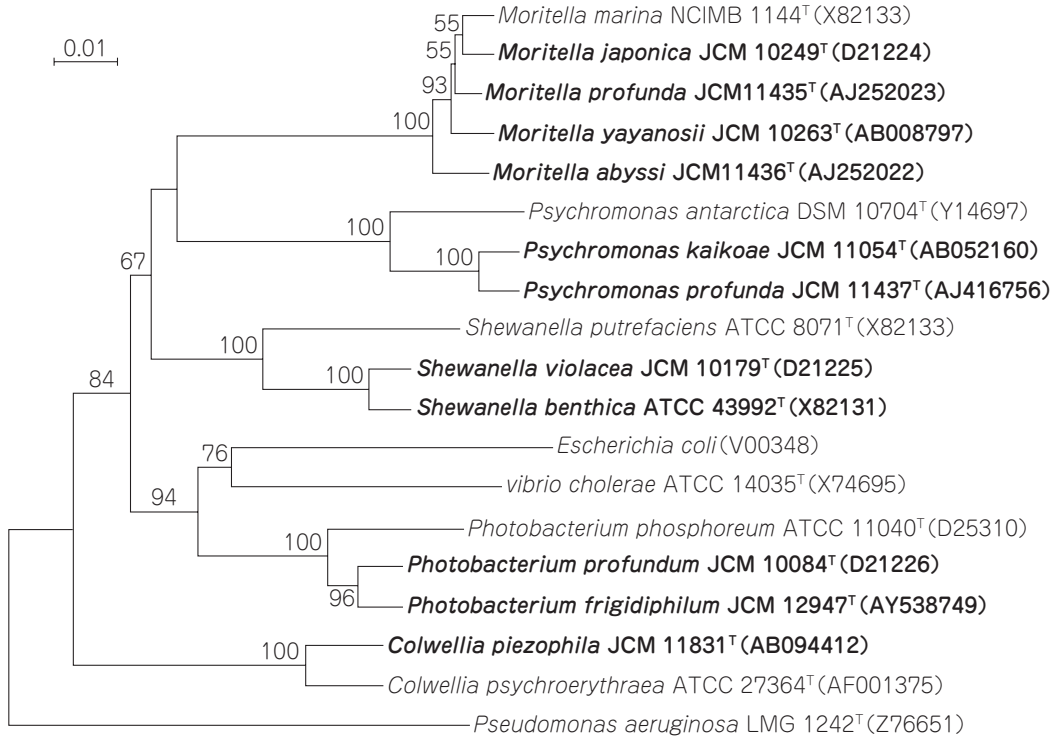


図3 深海低温高水圧環境に適応した好圧性微生物の16S リボゾーム RNA 遺伝子塩基配列に基づく系統樹

太字は、好圧菌を示す

2.1 *Shewanella* 属

最初に種として報告された好圧菌は、この属に含まれる *S. benthica* であった¹⁰⁾。本属は、地球環境に広く分布しているが、深海底からは、本種と *S. violacea* との2種が好圧菌として分離されている。ちなみに前述したマリアナ海溝底から分離された絶対好圧菌2種のうち1種は、*S. benthica* (DB21MT-2株) であった⁷⁾。本属に含まれる微生物種を並べて16SrRNA 遺伝子配列に基づく系統樹を書くと、図4のようになる。すなわち、本属の中で大きく2つのグループに分かれ、それぞれ *Shewanella* group 1, *Shewanella* group 2 とした。それぞれのグループの菌株の至適培養条件を比較すると、好圧菌 *Shewanella* 属を含む group 1 を構成する微生物は、そのすべてが好冷性で、しかも50 MPa程度の圧力下でも良好に生育できる性質を持っており、これらの微生物の分離源は、深海底泥や南極・北極域の氷の中や海水であった。一方、group 2 を構成する微生物は、中温性で、圧力感受性の微生物が多くその分離源は *S. frigidimarina* を除けば、主に陸域・浅海であった。こうしたことから、深海底で分離される *Shewanella* 属と寒冷の極域で分離されるものが極めて近縁で性質も似ていることから、好圧性 *Shewanella* 属細菌の起源は極域であり、これらの氷が溶けて深層海流の大循環の流れに乗って深海底の *Shewanella* が分布して現場に適応したと考えられている¹²⁾。好圧性 *Shewanella* 属細菌の中でも *S. violacea* DSS12株¹³⁾は、大気圧から70 MPa程度の高圧環境まで良好に生育できることから、好圧菌のモ

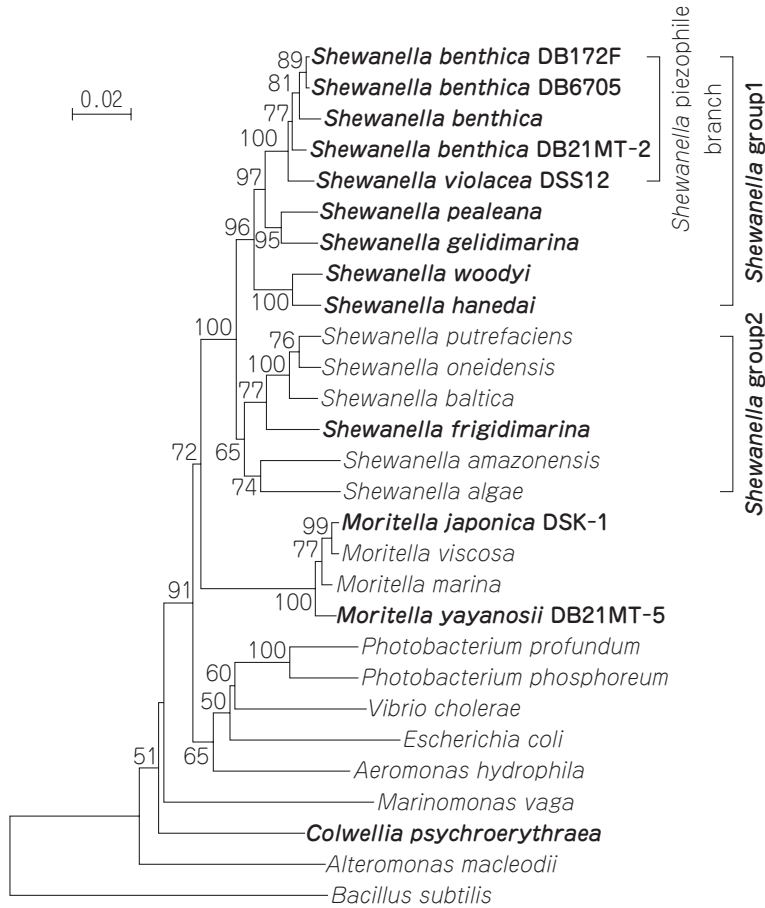


図4 *Shewanella* 属細菌各種における 16S リボゾーム RNA 遺伝子塩基配列に基づく進化系統樹

太字は、好圧菌、好冷菌を示す。*Shewanella* グループ1に属す微生物は、すべて、好圧菌、好冷菌であった

デル微生物としてゲノム解析も行われ¹⁴⁾、圧力環境適応の分子メカニズムを解明する研究のために利用されている（次項3参照）。

2.2 *Photobacterium* 属

Photobacterium 属細菌は、海洋細菌として代表的な微生物である *Vibrio* 属細菌とも極めて近縁な微生物である。本属に含まれる *P. profundum* は、好圧菌として同定された種であり、太平洋に位置する Sulu 海から分離された SS9 株や、琉球海溝深度 5,500 m から分離された DSJ4 株などが報告されている¹⁵⁾。なかでも、SS9 株は、米国の Bartlett らにより最初に加圧応答して遺伝子発現するタンパク質を発見した菌としても知られている¹⁶⁾。本株は、2005 年にゲノム解析が終了し¹⁷⁾、*S. violacea* DSS12 株と同様に好圧菌のモデル微生物として圧力応答の研究によく利用されている。本属としては、もう 1 種 *P. frigidophilum* が韓国のグループより、好圧菌として報告されている¹⁸⁾。

2.3 *Colwellia* 属

Colwellia 属は、通性嫌気性の好冷性細菌として定義された微生物属である。深海から分離された好圧菌として *C. hadaliensis* BNL-1 株が報告されている⁹⁾が、前述したように、残念ながらこの株は微生物保存機関に残っておらず、保管中に死滅してしまったと言われている。ここからも、好圧菌の長期保存の難しさが指摘されている。筆者らは、1990年代に入って液体窒素保存によりこうした株も保管できることを確認したが、本種に関しては後の祭りとなってしまった。しかしながら、2004年に日本海溝底泥より *C. piezophila* が分離され¹⁹⁾、この菌が高い好圧性を有することを証明し、本属が好圧菌を含む属であることを明らかとしたのである。

2.4 *Moritella* 属

本属のタイプストレインは、海洋環境から分離された *Moritella marina* で、以前は *Vibrio marinus* と呼ばれていた、好冷性の海洋細菌である^{20, 21)}。*Moritella* 属細菌は、その報告されている種すべてが好冷性、好圧性を持っており、16S rRNA 遺伝子配列に基づく進化系統樹からは、好圧菌を含む *Shewanella* 属細菌とも近縁である。この属の微生物は、日本海溝やマリアナ海溝等の深海からも好圧菌として分離され、それぞれ、*M. japonica*、*M. yayanosii* と命名されている^{22, 23)}。*M. yayanosii* は、絶対好圧菌で 80 MPa にその生育至適があり、50 MPa 以下の圧力ではほとんど生育できないことが報告されている⁷⁾。本属に含まれる好圧菌は、西アフリカの大西洋深海からも分離されているので (*M. abyssi*、*M. profunda*)²⁴⁾、世界中のあらゆる深海域に分布していることが推定されている。さらに、深海底に生息する生分解性プラスチック分解を有する菌としても、*Moritella* 属細菌が分離されており^{25, 26)}、このグループは有用細菌を含めた新規な機能を持つ微生物群としても着目されている。

2.5 *Psychromonas* 属

Psychromonas 属は、好冷性細菌として主に極域の環境から分離されてきた。この属の代表的な種は *Psy. antarctica* で、これは、南極の塩湖から分離された好冷菌である²⁷⁾。深海から分離された例としては、好圧菌 CNPT-3 株があったが、この株は、長年にわたって、好圧菌の謎のグループとして、その詳細が明らかではなかった²⁸⁾。しかしながら、2002年に、日本海溝水深約 7,500 m で採取された底泥から絶対好圧菌が分離され、その 16S rRNA 遺伝子の相同性比較から、CNPT-3 株と近縁で *Psychromonas* 属に含まれることが示されると、本属が、謎とされていた第 5 番目の好圧菌の属であることが明らかとなったのである²⁹⁾。このときの分離株は *Psy. kaikoe* と命名され、大西洋深海から分離された *Psy. profunda*³⁰⁾ と合わせ、本属から 2 種の好圧菌が報告されている。

2.6 好圧菌の細胞膜脂肪酸の特徴

DeLong らの報告^{31, 32)}によると、好圧性微生物は低温、高水圧の環境でも細胞膜の流動性を確保するために、細胞膜脂肪酸として分岐鎖のある不飽和脂肪酸の含量を多く含み、なかんずく高度不飽和脂肪酸、エイコサペンタエン酸 (EPA, C20:5) やドコサヘキサエン酸 (DHA,

C22:6) を特徴的に含むとされていた。事実, *Shewanella* 属, *Photobacterium* 属では EPA を, *Moritella* 属では DHA, *Psychromonas* 属ではその両方を含むことを確認した。しかしながら, *Colwellia* 属では EPA, DHA とも含まず, その代わりに大量の分岐鎖脂肪酸 C16:1 を含んでいた (表 1)。*S. violacea* においては, EPA 欠損変異株がその加圧下の増殖において顕著な阻害を受けること³³⁾から, EPA の重要性が指摘されているが, *P. profundum* においては, その含有する EPA よりも, 分岐鎖脂肪酸の C18:1 の存在の有無がその加圧下での生育の能力にとってより本質的な影響を与えている, という結果が報告されており³⁴⁾, どういった脂肪酸が加圧下での生育にとってポジティブな役割を果たすかは, 菌により異なっていると考えられている。これらの事実から, 好圧菌にとって EPA, DHA などの高度不飽和脂肪酸を持つことは, 必須のこと

表 1 各属好圧菌の細胞膜脂肪酸の含量%比較

Fatty acid	Sh	Ph	Co	Mo	Ps
12:0	2	2	1		1
14:0	13	3	3	15	6
15:0		1	3	1	1
16:0	14	9	31	13	15
17:0					
18:0		1			
iso-13:0	5	2			
iso-14:0		4			
iso-15:0	11	2			
iso-16:0		15			
14:1		3	9	6	10
15:1			2		
16:1	31	31	50	53	55
17:1					
18:1	2	9		1	2
[EPA] 20:5	16	13			2
[DHA] 22:6				11	2
3OH-12:0	1	5	1		2
3OH-iso-13:0	5				
3OH-14:0					4
Unsaturate (%)	49	56	61	71	71
Saturat (%)	51	44	39	29	29
Ratio (U/S)	0.96	1.27	1.56	2.45	2.45

Sh, *Shewanella benthica* ATCC 43992^T; Ph, *Photobacterium profundum* JCM 10084^T;

Co, *Colwellia piezophila* Y223G^T; Mo, *Molitella yayanosii* JCM 10263^T

Ps, *Psychromonas kaikoeae* JCM 11054^T.

ではなく、むしろ分岐鎖を持つ不飽和脂肪酸の全体的な含量が高いことが、好圧菌にとってのより一般的な性質であるということが理解できる。

3 好圧性微生物の加圧応答のメカニズム

好圧性微生物は、その生育が深海の高水圧下に適応しているの、遺伝子発現やタンパク質の活性発現等のメカニズムも、圧力環境に適応していると考えられている。筆者らが琉球海溝深度約5,000 mから分離した *Shewanella violacea* DSS12は、8℃、30 MPaに生育至適を持つ好冷好圧菌であるが(図5)^{13,35)}、圧力プロファイルを見ると大気圧から70 MPaまで非常になだらかに生育できる非常にモデレートな好圧菌である。すなわち、大気圧下から高圧まで、その生育や細胞の生死に関連するような激しい生理学的な影響を受けることが少ないと思われ、したがって、大気圧下と加圧下との遺伝子発現やタンパク質などの比較を試みるには、適当なモデル微生物であることが指摘されている。そこで、本項では、好圧菌 *S. violacea* を主な材料として、加圧応答のメカニズムについて、これまでわかってきていることを解説する。

3.1 遺伝子発現の圧力制御

S. violacea ゲノムから、加圧応答して発現する遺伝子プロモーターを探索した結果、複数の遺伝子の発現を制御する加圧応答オペロンを発見した³⁶⁾。本オペロンのプロモーター部分は5カ所の転写開始サイトを持ち、それぞれの転写のレベルで圧力に対して正の応答をすることがわかった³⁷⁾。このプロモーター部分の配列を解析した結果、窒素代謝に重要な役割を果たすとされているRNAポリメラーゼの転写因子の1つであるシグマ54にコンセンサスのある配列を見出した。事実、本配列に *S. violacea* のシグマ54因子が結合することを実験的に確認した³⁷⁾。

シグマ54因子が転写に関与する代表的な遺伝子として、*glnA* オペロンがある³⁸⁾。この *glnA* というのは、グルタミン合成酵素をコードする遺伝子で、微生物における窒素代謝では重要な役割を果たしている。*S. violacea* の *glnA* オペロンの遺伝子発現の加圧応答を確認したところ、加

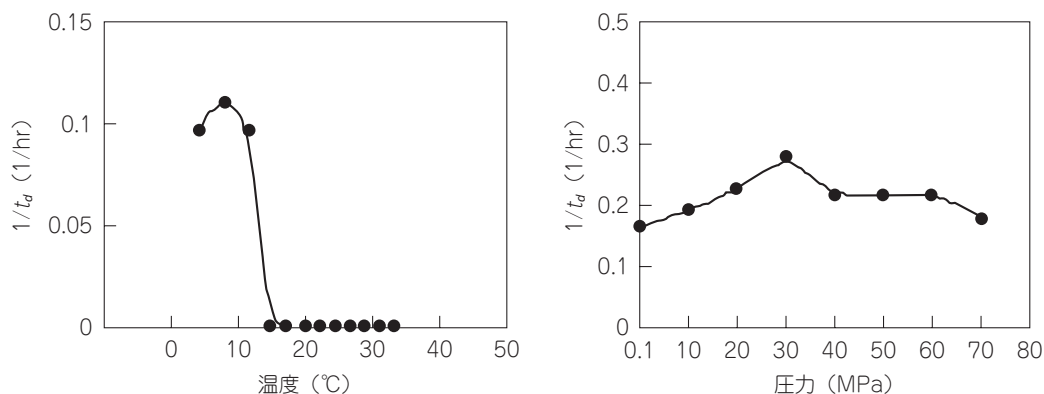


図5 *Shewanella violacea* DSS12の生育に関する温度(左)と圧力(右)のプロファイル
縦軸は生育速度(倍加時間 t_d の逆数)

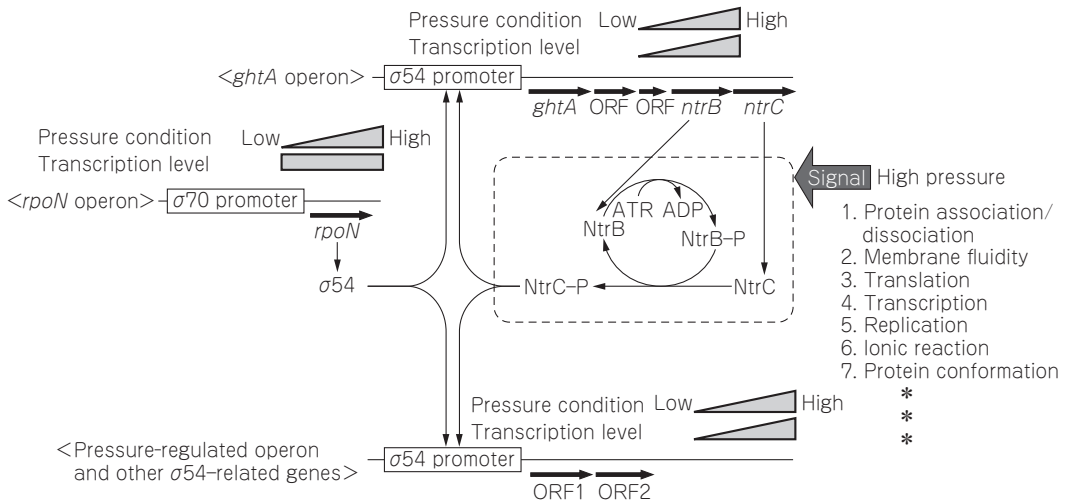


図6 *S. violacea* における、シグマ 54 因子に関する、加圧応答遺伝子発現モデル（加藤—仲宗根モデル）

加圧刺激により NtrB がリン酸化され、NtrC → σ^{54} 因子へとリン酸化リレーされ、リン酸化活性化された σ^{54} 因子が、遺伝子発現を促す

圧によってその発現が増幅している現象が見られ、シグマ 54 因子に関する転写のレベルでの圧力制御が行われていることがわかった³⁹⁾。これらの実験結果から、シグマ 54 因子が加圧応答する転写に深く関わっていることが示された⁴⁰⁾。

しかしながら、シグマ 54 因子それ自身の発現は、圧力制御は受けずどのような圧力下でも構成的に発現していること⁴¹⁾から、シグマ 54 因子のプロモーター部分への DNA 結合能を活性化させるメカニズムに、加圧応答のカギがあると考えられた。大腸菌などでの先行研究で、シグマ 54 因子の活性化には、膜タンパク質である NtrB と NtrC という 2 コンポーネント制御システムが関与していることが報告されているが、シグマ 54 の DNA 結合活性の活性化のためには、発現した NtrB → NtrC へのリン酸化リレーが重要であるとされている⁴²⁾。好圧菌の場合、圧力刺激によりリン酸化された NtrB-P が NtrC へとリン酸を受け渡し、NtrC-P がシグマ 54 因子をリン酸化して活性化するというメカニズムが考えられる。この NtrB, C をコードする遺伝子、*ntrB*, *ntrC* は、*S. violacea* においても *glnA* オペロンの下流部分に含まれていることが確認されており⁴³⁾、構成的にわずかに発現していた NtrB, C が加圧によりシグマ 54 因子を活性化して、GlnA（グルタミン合成酵素）とあわせて、自ら NtrB, C を更に発現させていくという加圧応答のメカニズムが見えてきた。こうして活性化されたシグマ 54 因子は、*glnA* オペロンだけではなく、前述した加圧応答オペロンも含めて、本因子の関わる複数の遺伝子発現の加圧応答を引き起こしていることが推定された。こうしたシグマ 54 因子が関わる加圧応答遺伝子発現モデルとして、加藤—仲宗根モデルが提唱された（図 6）⁴⁰⁾。

3.2 呼吸系

前述した加圧応答オペロンの下流に呼吸系のタンパク質に関わる 2 つの遺伝子 *cydD*, *cydC* を

見出し、これらの遺伝子産物に關するシステムもまた加圧応答に關する可能性があることが考えられた³⁶⁾。大腸菌において *cydD*、*C* 遺伝子産物は、呼吸系で低酸素ストレス時に特徴的に発現している、呼吸系末端酸化酵素、シトクローム *bd* キノールオキシダーゼのサブユニットアッセンブリーに關与していることが報告されており^{44~46)}、加圧応答でも何らかの役割を果たしていることが考えられた。そこで、大腸菌の *cydD* を欠損している株を入手し、加圧下 (30 MPa) での生育を確認したところ、確かに大気圧下と比較して加圧下での増殖が極端に悪かった。この株に *S. violacea* の *cydD* 遺伝子を導入したところ、加圧下での増殖能力が回復し、本遺伝子が加圧下での微生物の生育に重要であることが確認された⁴⁷⁾。

一方、*S. violacea* において、大気圧下の培養条件にて発現していた *c* タイプのシトクロームに代わって、加圧下の培養条件において *d* タイプのシトクロームがその膜成分に特徴的に存在することを分光光学的な手法で確認した⁴⁸⁾。そこで、シトクローム *bd* キノールオキシダーゼを構成するサブユニット遺伝子 *cydA*、*cydB* の発現を解析したところ、やはり加圧により転写レベルで発現誘導されていることがわかり、これらのアッセンブリータンパク質をコードする *cydD*、*cydC* とともに、加圧応答して発現していることが確認された⁴⁹⁾。大気圧下において使われている末端酸化酵素シトクローム *c* オキシダーゼは、シトクローム *c* 自身の発現が一部加圧条件によって阻害を受けることから⁵⁰⁾、加圧下でこの末端酸化酵素が利用されている可能性は低い。これらの結果を総合すると、加圧下では、呼吸系のコンポーネントがスイッチングされ、その末端酸化酵素としてシトクローム *bd* キノールオキシダーゼが利用されているスキームが見えてきた (図7)。

なぜ、こうした呼吸系のスイッチングが加圧に答して起こるのかの生理学的なメカニズム

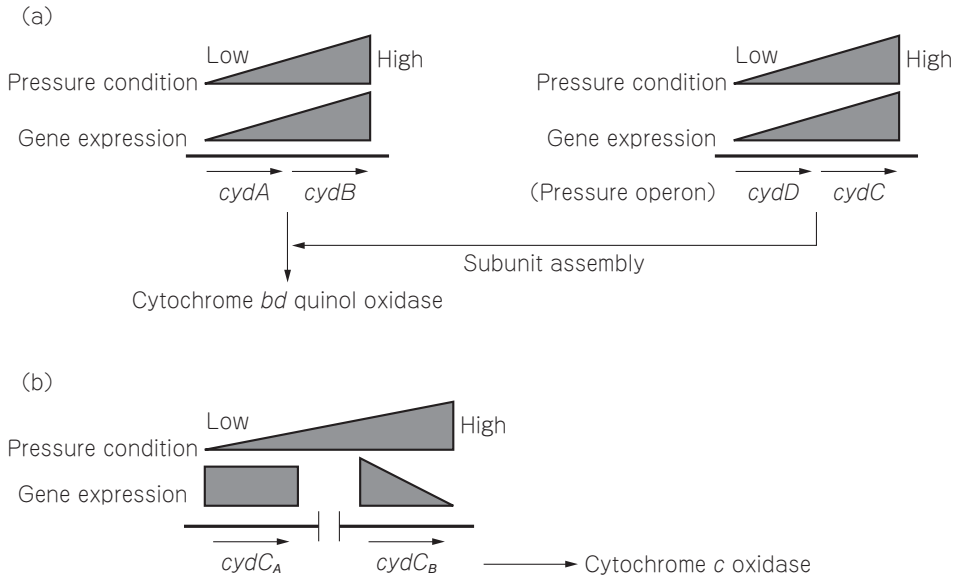


図7 *S. violacea* における呼吸系の加圧応答モデル

- (a) シトクローム *bd* キノールオキシダーゼシステム、加圧条件下でよく働く
- (b) シトクローム *c* オキシダーゼシステム、大気圧下の条件で働く

については、今後のさらなる検討を待たねばならないが、近縁好圧菌の *S. benthica* において、加圧条件下では、呼吸系のコンポーネントの数が減ってよりコンパクトに電子伝達されていく、との報告もあり^{51,52}、低栄養の深海高圧環境下で生きていくために、より省エネのメカニズムが発達したのであろうとする考え方も出されている。

3.3 細胞分裂タンパク質 FtsZ

大腸菌では、加圧条件下では細胞分裂が阻害され、50 MPa の圧力下では全く分裂しなくなるという現象が起こる⁵³。この状態でも、細胞を維持・増殖する機能は十分に働いているので、分裂ができない分、細胞はフィラメント状に伸びていってしまう。こうしてフィラメント状になった大腸菌を脱圧し、大気圧下になると直ちに細胞分裂が起こるので、細胞分裂の機能は維持されたまま分裂という現象が圧力により阻害されていると考えられる。これに反して、好圧菌においては、加圧下でよく細胞分裂し大気圧下では分裂しないという様子が観察された (図 8)。

大腸菌における細胞分裂タンパク質 FtsZ の発現を、50 MPa の分裂が起こらない加圧条件下で検討した結果、遺伝子の転写レベルでもタンパク質発現のレベルでも正常に発現していることが確認された。このことから、加圧による分裂阻害は、FtsZ が内蔵する GTPase 活性による分裂リング (重合体) 形成自体を圧力が阻害しているのではないかということが考えられた。そこで、大腸菌の FtsZ タンパク質を精製し、*in vitro* の条件で本タンパク質に GTP を添加してリング形成反応 (タンパク質の重合反応) を行う実験を各種圧力条件下で行った。電子顕微鏡により各圧力条件下での反応産物を確認したところ、大気圧下では FtsZ タンパク質が重合してひも状に絡んでいるのに対し、30 MPa ではその数が減少し、50 MPa ではほとんど重合したタンパク質を確認することはできなかった (図 9)。以上のことから、大腸菌の 50 MPa における分裂阻害の原因は、FtsZ タンパク質自体が持つ GTP 依存性の重合反応が圧力により阻害されることが確認された⁵⁴。

一方、好圧菌 *S. violacea* では、0.1~50 MPa の圧力範囲内において、FtsZ タンパク質の発現とリング形成反応は全く制約を受けず、この圧力範囲内において常に起こっていることが確認され、本好圧菌において高圧下で正常な細胞分裂が行われていることを裏付ける結果を示した⁵⁵。これらのことから、大腸菌における加圧下での細胞分裂阻害は、分裂タンパク質である FtsZ の

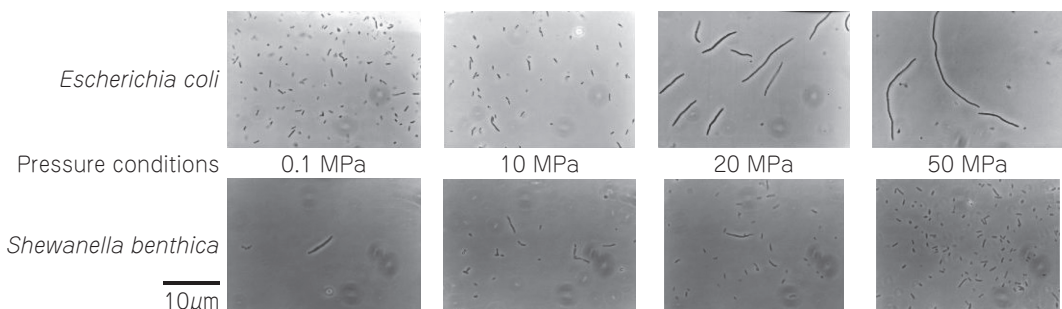


図 8 大腸菌と好圧菌 *S. benthica* の各圧力下における顕微鏡観察写真

大腸菌は加圧に伴い細胞分裂が阻害されるのに対し、好圧菌では逆に加圧に伴い分裂が促進される

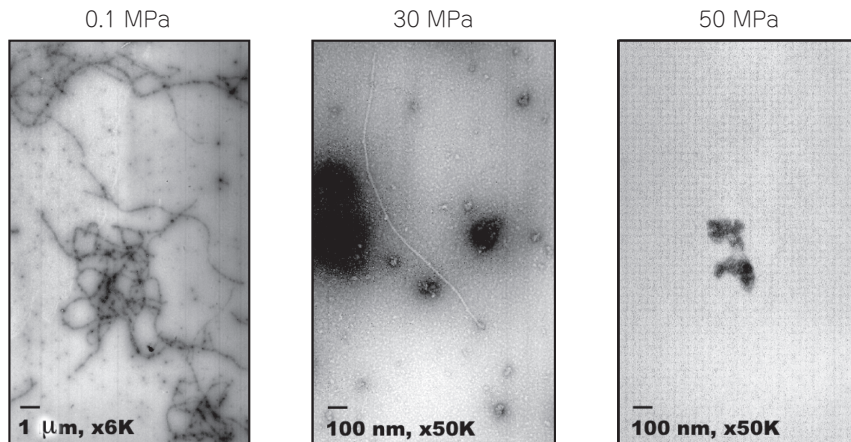


図9 大腸菌由来の FtsZ タンパク質の GTP 添加時の *in vitro* 重合反応と圧力条件との相関

透過型電子顕微鏡により撮影

重合反応を圧力条件が阻害することが原因であることがわかった。これと比較して、好圧菌の分裂タンパク質は、加圧下でもその重合活性が損なわれず、正常に生育することが明らかとなった。FtsZ の重合反応に関わるとされている C 末端側のアミノ酸配列は、大腸菌と *S. violacea* の FtsZ タンパク質間では他の部分と比較して相同性が低く、この領域のアミノ酸配列の違いが、加圧下での分裂の有無を決めているのではないかと推定した⁵⁵⁾。

3.4 RNA ポリメラーゼ

RNA ポリメラーゼのような、複数の異なるサブユニットから構成されるタンパク質の加圧下での構造安定性を測定するために、高压電気泳動装置 (High-pressure electrophoresis apparatus ; HPEA, 図 10) を開発した。HPEA は、キャピラリー管内にポリアクリルアミドゲル (PAG, 変成剤の入っていないゲル) を固め、加圧下で 1 次元の電気泳動を行うことができるようにした装置である。一次元の泳動後、通常のスラブ型の SDS-PAGE の上に泳動後のキャピラリーゲルを重ね二次元目の電気泳動を行い、二次元的に展開されたタンパク質染色のパターンを見る。もし加圧処理によりサブユニット構造が解離したりすると、一次元泳動でそれぞれのサブユニットが低分子側に展開されるが、圧力に耐性が高いと高分子側にとどまることになる。二次元泳動で、それぞれのサブユニットが同定されるので、加圧による解離の状態が推定できることになる⁵⁶⁾。

本 HPEA を用いて、代表的な RNA ポリメラーゼである α , β , β' , σ^{70} の 4 つの因子から成る複合体酵素の加圧による影響を、大腸菌と好圧菌 *S. violacea* 由来の同酵素とで比較した。その結果、大腸菌酵素では、140 MPa の加圧条件でほぼ完全にこれら 4 つのサブユニットが解離しており (図 11(a)), 高圧下で極めて不安定であることが推定された。これに対し、*S. violacea* の酵素では、140 MPa の加圧下においても安定で、サブユニット構造が解離する様は見られなかった (図 11(b))。また別の実験結果から、*S. violacea* 酵素における加圧下の安定性は、主に

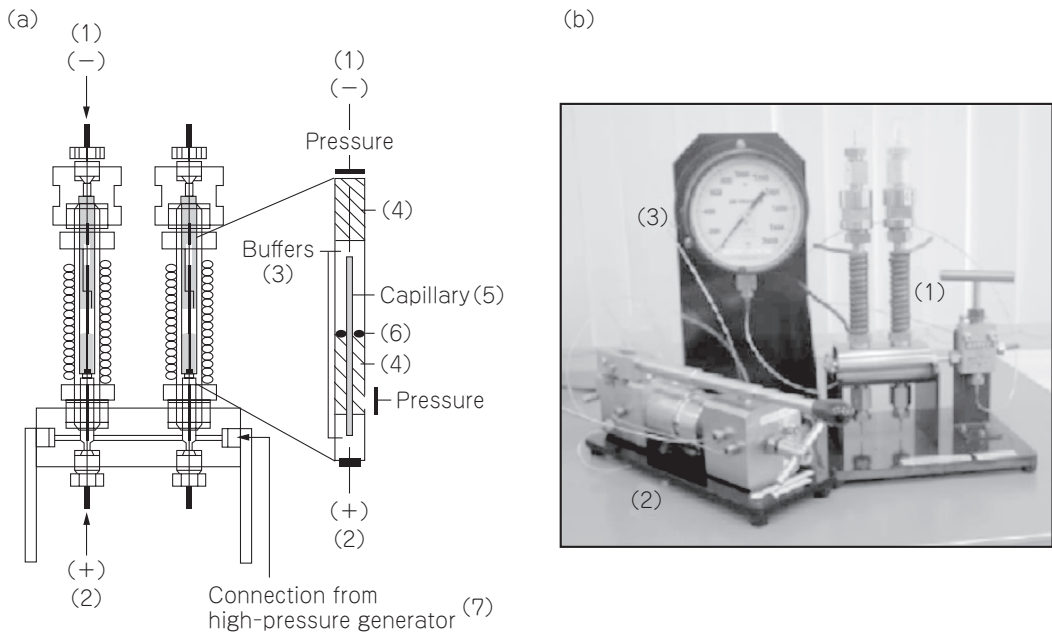


図10 高圧電気泳動装置 (HPEA)

(a) 高圧電気泳動槽。(1) (2) パワーサプライとのコネクター, (3) 泳動用バッファ, (4) シリコンオイル KF96-1.5CS, (5) ガラス製のマイクロキャピラリーチューブ, (6) 上下のスペースを分けるための Oリング, (7) 高圧ポンプとのコネクター

(b) HPEA システム全体写真。(1) 高圧電気泳動槽, (2) 水圧ハンドポンプ, (3) 圧力ゲージ

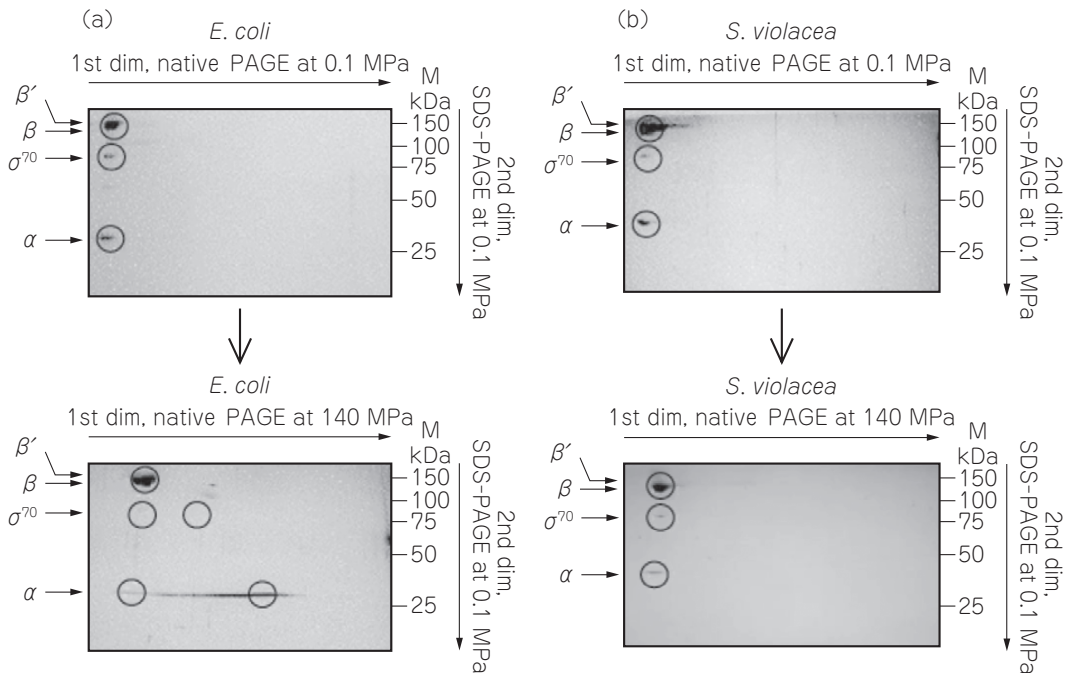


図11 HPEA システムによる RNA ポリメラーゼサブユニットの解離実験

上段が 0.1 MPa, 下段が 140 MPa 圧力印加時のパターン

(a) 大腸菌 RNA ポリメラーゼ, (b) *S. violacea* RNA ポリメラーゼ

σ^{70} サブユニットが担っている可能性が示唆された。大腸菌と *S. violacea* の本サブユニットの構造的な特徴を見ると、大腸菌酵素には存在しない β シート構造が、*S. violacea* 酵素においてその存在が見られるなど、いくつかの構造的な違いが推定され、こうした違いが好圧菌 RNA ポリメラーゼの高圧下での高い安定性に寄与していると考えられた⁵⁶⁾。これらのデータを提供できる HPEA システムは、加圧下のタンパク質の挙動を見るための大変有効な道具であることが確認された。

3.5 ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR)

ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) は、RNA 代謝の必須酵素であり、すべての生物が共通して保有している酵素の1つである。したがって、研究例も多く、比較研究がしやすいということで、この酵素に関して高圧分光光度計のシステム¹¹⁾を用いて加圧下における活性の検討を行った⁵⁷⁾。その結果、大腸菌の DHFR では、圧力のレベルが上がるのに従って活性が減少していく様が見られた。通常、タンパク質への圧力効果は、体積が減少していく方向に作用するので、本酵素の場合、その活性化体積は体積が増加する方向に向かうことが示唆された。事実、加圧下の活性プロファイルから、大腸菌 DHFR の加圧による活性化体積 ΔV^\ddagger を計算したところ、

$$\Delta V^\ddagger (\text{mL/mol}) = 8.1 \pm 0.8$$

となり、正の値を示し加圧により活性が減少することが裏付けられた。

一方、好圧菌 *S. violacea* の DHFR においては、加圧に従って活性が増加する様が見られ、100 MPa をピークに活性が減少していくプロファイルが得られた。しかしながら、250 MPa の条件下でも大気圧よりも高い活性が得られて、極めて耐圧性の高い酵素であることが示された。

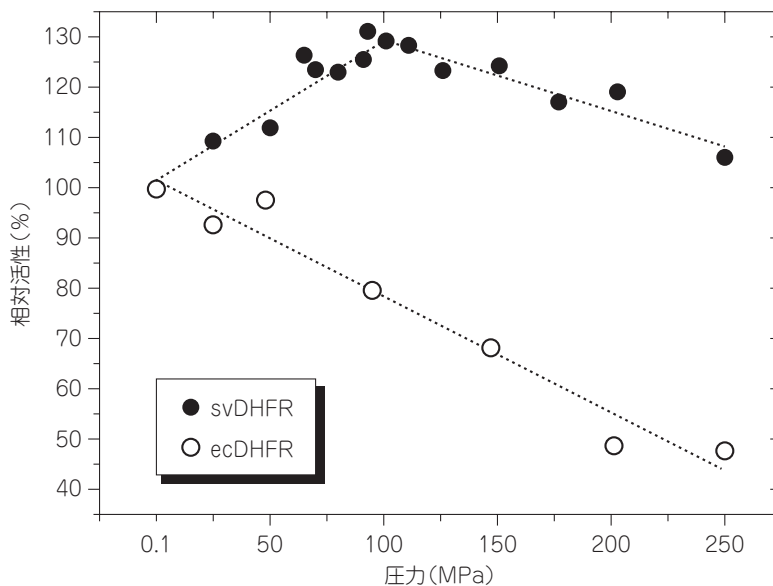


図 12 大腸菌と *S. violacea* 由来のジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) の加圧下における活性プロファイル

● *S. violacea* DHFR (svDHFR), ○ 大腸菌 DHFR (ecDHFR)

S. violacea の $\Delta V^\#$ 値を計算したところ、

$$0.1 \sim 100 \text{ MPa} \quad \Delta V^\# (\text{mL/mol}) = -5.8 \pm 0.8$$

$$100 \sim 250 \text{ MPa} \quad \Delta V^\# (\text{mL/mol}) = 2.7 \pm 0.4$$

であった。着目すべきは、大気圧から 100 MPa までの活性化体積値がマイナスの値を示し、加圧による本酵素体積の減少が、より高い酵素活性を促したということで、本酵素がより高圧環境下に適応した酵素となっていることが示された点である⁵⁷⁾。これらの結果は、好圧菌酵素が構造的に圧力環境に適応していて、その性質を規定していることを示唆している。これらの DHFR の活性における圧力プロファイルを図 12 に示した。

3.6 イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素 (IPMDH)

次に、必須アミノ酸の1つであるロイシンの生合成系のキー酵素であるイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素 (IPMDH) での研究例を紹介する。本酵素の比較においては、*Shewanella* 属に含まれる複数の異なる深度から分離された種・株を用いて実施された。陸上環境由来種としては、*S. oneidensis* MR-1⁵⁸⁾、深海好圧菌種としては、これまで述べてきた *S. violacea* DSS12 と、日本海溝深度約 6,400 m の海底より分離された *S. benthica* DB6705^{34, 35)}、マリアナ海溝深度約 11,000 m の海底より分離された *S. benthica* DB21MT-2⁷⁾ を用いた。ちなみに、高圧下での生育能力は、

$$S. \textit{oneidensis} < S. \textit{violacea} < S. \textit{benthica} \text{ DB6705} < S. \textit{benthica} \text{ DB21MT-2}$$

の順に高くなり、DB21MT-2 株においては生育至適圧力を 70 MPa に持つ絶対好圧菌であるこ

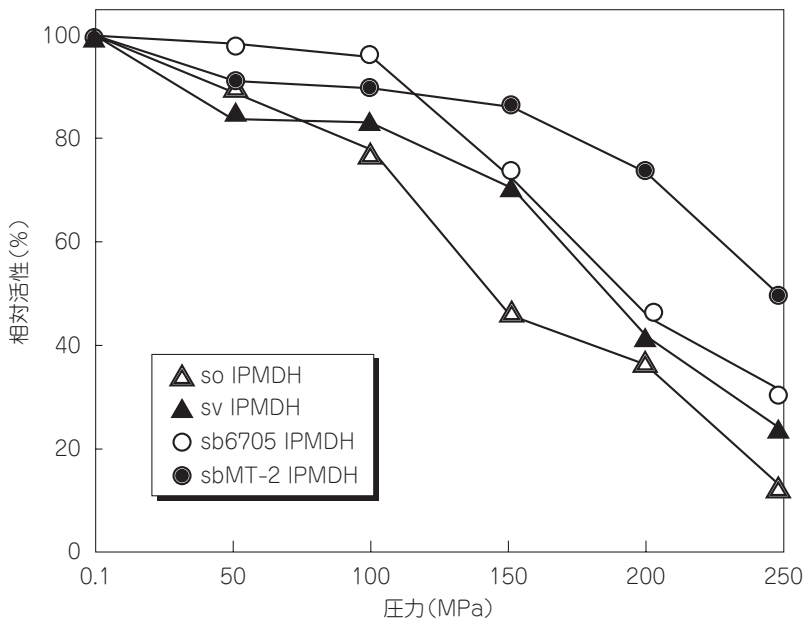


図 13 各種 *Shewanella* 属細菌由来のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素 (IPMDH) の加圧下における活性プロファイル

- △ *S. oneidensis* IPMDH (soIPMDH), ▲ *S. violacea* IPMDH (svIPMDH),
- *S. benthica* DB6705 IPMDH (sb6705IPMDH),
- *S. benthica* DB21MT-2 IPMDH (sbMT-2IPMDH)

とが示されている⁷⁾。これらの株から IPMDH を取得し、高圧分光光度計を用いてそれぞれの加圧下での活性を比較した (図 13)。その結果、150~250 MPa の高圧条件下において、それぞれの IPMDH の活性は、その酵素由来の菌株の高圧下での生育能力の順番にきれいに並んでいる。すなわち、マリアナ分離株 DBMT-2 株由来の酵素が最も高圧下での残存活性が高く、以下 DB6705 株、*S. violacea*、*S. oneidensis* 由来の酵素へと活性が下がっていくことが示された⁵⁹⁾。

これらの IPMDH におけるアミノ酸配列を比較すると、極めて類似性が高く、*S. oneidensis* と *S. benthica* DB21MT-2 の IPMDH 間でも、85.1% の相同性がある。そこで、今後、これらのアミノ酸配列間の相違から、高圧下での活性維持に必要な好圧菌特有の構造的な特徴を見出していくことが重要であると思われる。

3.7 ゲノム解析

モデル好圧菌として最も汎用的に利用されている 2 種の深海微生物のゲノム解析が完了している。1 つは、米国カルフォルニア大学スクリプス海洋研究所とイタリア Padua 大学との共同研究で *P. profundum* SS9 のゲノムが報告された¹⁶⁾。もう 1 つは、筆者らと奈良先端大学、慶応大学との共同研究で *S. violacea* DSS12 のゲノム解析を達成した¹³⁾。この 2 つの好圧菌種は、いずれも大気圧から高圧まで良好に生育できる好圧菌で、圧力条件を変化させての遺伝子発現や生理学的解析を研究するための材料として非常に優れている。

P. profundum においては、ゲノム解析と平行して、遺伝子発現の加圧応答するメカニズムについて詳細に検討されており、なかんずく細胞がいかに圧力をセンシングするかという点に着目し、細胞膜脂肪酸の不飽和化との関係性を明らかにしている⁶⁰⁾。一方、*S. violacea* においても、「3.1 遺伝子発現の圧力制御」で記述したように、細胞膜タンパク質である NtrB タンパク質が環境圧力をセンシングしてリン酸化され、加圧応答発現のネットワークの引き金を引く、という機構⁴⁰⁾が提唱されており、好圧菌において、「細胞膜」が環境圧力のセンシングを担っているということは間違いないと思われる。

S. violacea のゲノム解析から、本好圧菌ゲノムは 4,962,103 塩基対から成り、14 個のリボソームオペロンを有していることがわかった。このように数多くのリボソームオペロンを有しているのは、高圧下の極限環境下への適応戦略と関係しているとの指摘もある。本ゲノムからは、4,346 個の遺伝子が同定され、アノテーション解析では、その半数以上が既知の遺伝子とは相同性が低く、未知遺伝子が多く含まれていることも示唆された (図 14)。既知遺伝子と同定された中からは、プロテアーゼやセルラーゼ、キチナーゼ、EPA 生合成系遺伝子クラスター等々といった、産業応用や有用性のある多くの酵素遺伝子も含まれており、今後の産業展開に向けた研究の進捗も期待されている。

4 おわりに

本稿では、筆者らの研究室を中心に達成された、深海好圧性微生物に関する研究の成果の概要を中心に記述した。1990 年に、海洋科学技術センター (当時の名称、現独立行政法人海洋研究

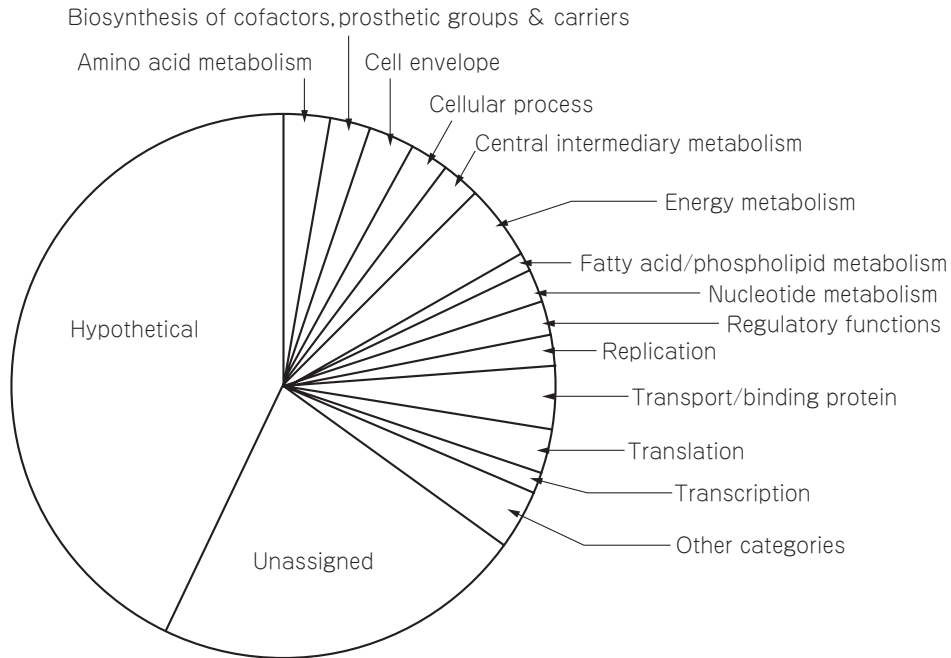


図 14 *S. violacea* ゲノムから見つかった全 4,346 遺伝子のアノテーション結果
全体の半分以上の遺伝子が、機能未知遺伝子であった

開発機構)において、深海微生物研究が DEEPSTAR 計画として本格的に開始されてから、早くも 20 年以上の歳月が流れたわけであるが、深海微生物、なかんずく好圧性微生物の世界はそれ以前と比べて、格段に大きく開かれてきた感がある。今日まで、加圧による遺伝子発現制御のメカニズムを始めとする分子遺伝学的な問題点は、相当明らかになってきている。また、ここまで記述してきたように、好圧菌の作る酵素は大気圧下に適応している微生物の作る酵素と比較して、加圧下での残存活性が極めて高く、150~250 MPa とした彼らの生息している水深の圧力よりもはるかに高いところでも活性を維持している。すなわち、極めて高い耐圧性を有しているということになる。しかしながら、こうした好圧菌の酵素タンパク質の高い耐圧性のメカニズムについては、いまだよくわかっていないというのが現状である。したがって、今後の研究課題として、「なぜ、好圧菌の酵素タンパク質は、高圧下で活性を維持できるのか。またそのメカニズムはどうなっているのか」という点が残されている。

こうした課題を解決するためには、分子生物学の枠を超えて、筆者ら好圧菌研究者と構造生物学者とのコラボレーションが必要である。すなわち、好圧菌酵素を材料として、酵素タンパク質の三次元立体構造のレベルで圧力環境がその構造を構成する 1 つひとつのアミノ酸にいかん作用するのか、明らかにすることが重要である。こうした研究目的を達成するために、近年名古屋大学のグループが高圧 X 線結晶解析の技術開発を行った⁶¹⁾。筆者は、こうした新技術と共同研究のネットワークを構築し、好圧菌酵素の圧力耐性メカニズムの解明に向け、さらに深くメスを入れていきたい。そして、タンパク質そのものにおける圧力耐性の一般則を導き出すことを大きな

目標として、さらに意欲的に研究に取り組んでいきたいと考えている。

謝辞

本稿で述べた研究成果は、筆者の所属する独立行政法人海洋研究開発機構でなされた、過去20年余にわたる好圧菌研究によるものである。本研究を暖かくも厳しく見守り、不断のサポートを続けてくれた、掘越弘毅東京工業大学名誉教授に感謝申し上げます。また、研究室の仲間としてともに汗を流した、Maria Smorawinska 博士、Lina Li 博士、佐藤孝子博士、能木裕一博士、仲宗根薫近畿大学教授、為我井秀之日本大学准教授、Mohammad Hassan Qureshi 博士、大前英二広島大学准教授、Linda De Poorter 博士に感謝する。さらに、筆者の研究室に学生として門を叩いてくれた、池上昭彦博士、山田光則博士、石井秋宏博士、河野広朗博士をはじめとする、多くの卒業生諸君に感謝する。最後に、深海調査航海や潜水調査船による深海でのサンプリングなどに多大のご協力をいただいた、当海洋研究開発機構の船舶運航関係者、潜水調査船運用関係者の皆様に心より謝意を表明する。

■参考・引用文献

- 1) A. Certes : *C. R. Acad Sci Paris*, **98**, 690 (1884).
- 2) C. E. Zobell and F. H. Johnson : *J Bacteriol*, **57**, 179 (1949).
- 3) C. E. Zobell and R. Y. Morita : *J Bacteriol*, **73**, 563 (1957).
- 4) A. A. Yayanos, A. S. Dietz and R. Van Boxtel : *Science*, **205**, 808 (1979).
- 5) A. A. Yayanos, A. S. Dietz and R. V. Boxtel : *Proc Natl Acad Sci USA*, **78**, 5212 (1981).
- 6) J. Piccard and R. S. Dietz : *Seven miles down*, G. P. Putnum and Sons, New York (1961).
- 7) C. Kato, L. Li, Y. Nakamura, Y. Nogi, J. Tamaoka and K. Horikoshi : *Appl Environ Microbiol*, **64**, 1510 (1998).
- 8) J. W. Deming, H. Hada, R. R. Colwell, K. R. Luehrsens and G. E. Fox : *J Gen Microbiol*, **130**, 1911 (1984).
- 9) J. W. Deming, L. K. Somers, W. L. Straube, D. G. Swartz and M. T. Macdonell : *System Appl Microbiol*, **10**, 152 (1988).
- 10) M. T. MacDonell and R. R. Colwell : *Syst Appl Microbiol*, **6**, 171 (1985).
- 11) C. Kato : 5.6 Cultivation methods for piezophiles. In : "Extremophiles Handbook" (Eds. K. Horikoshi, G. Antranikian, A. Bull, F. Robbg. Stetter), Springer-Verlag, Tokyo, pp. 719-726 (2011).
- 12) C. Kato and Y. Nogi : *FEMS Microbiol Ecol*, **35**, 223 (2001).
- 13) Y. Nogi, C. Kato and K. Horikoshi : *Arch Microbiol*, **170**, 331 (1998).
- 14) E. Aono, T. Baba, T. Ara, T. Nishi, T. Nakamichi, E. Inamoto, H. Toyonaga, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, M. Tomita, C. Kato, T. Oshima, K. Nakasone and H. Mori : *Mol BioSyst*, **6**, 1216 (2010).
- 15) Y. Nogi, N. Masui and C. Kato : *Extremophiles*, **2**, 1 (1998).
- 16) D. Bartlett, M. Wright, A. A. Yayanos and M. Silverman : *Nature*, **342**, 572 (1989).
- 17) A. Vezzi, S. Campanaro, M. D'Angelo, F. Simonato, N. Vitulo, F. M. Lauro, A. Cestaro, G. Malacrida, B. Simionati, N. Cannata, C. Romualdi, D. H. Bartlett and G. Valle : *Science*, **307**, 1459 (2005).
- 18) H. J. Seo, S. S. Bae, J. H. Lee and S. J. Kim : *Int J Syst Evol Microbiol*, **55**, 1661 (2005).
- 19) Y. Nogi, S. Hosoya, C. Kato and K. Horikoshi : *Int J Syst Evol Microbiol*, **54**, 1627 (2004).
- 20) R. R. Colwell and R. Y. Morita : *J Bacteriol*, **88**, : 831 (1964).
- 21) H. Urakawa, K. Kita-Tsukamoto, S. E. Steven, K. Ohwada and R. R. Colwell : *FEMS Microbiol Lett*, **165**, 373 (1998).
- 22) Y. Nogi, C. Kato and K. Horikoshi : *J Gen Appl Microbiol*, **44**, 289 (1998).

- 23) Y. Nogi and C. Kato : *Extremophiles*, **3**, 71 (1999).
- 24) Y. Xu, Y. Nogi, C. Kato, Z. Liang, H-J. Rüger, D. D. Kegel and N. Glansdorff : *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53**, 533 (2003).
- 25) T. Sekiguchi, T. Sato, M. Enoki, H. Kanehiro and C. Kato : *JAMSTECR*, **11**, 33 (2010).
- 26) T. Sekiguchi, T. Sato, M. Enoki, H. Kanehiro and C. Kato : *J Jpn Soc Extremophiles*, **9**, 25 (2010).
- 27) D. O. Mountfort, F. A. Rainey, J. Burghardt, F. Kasper and E. Stackebrandt : *Arch Microbiol*, **169**, 231 (1998).
- 28) E. F. DeLong, D. G. Franks and A. A. Yayanos : *Appl Environ Microbiol*, **63**, 2105 (1997).
- 29) Y. Nogi, C. Kato and K. Horikoshi : *Int J Syst Evol Microbiol*, **52**, 1527 (2002).
- 30) Y. Xu, Y. Nogi, C. Kato, Z. Liang, H-J. Rüger, D. D. Kegel and N. Glansdorff : *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53**, 527 (2003).
- 31) E. F. DeLong and A. A. Yayanos : *Science*, **228**, 1101 (1985).
- 32) E. F. DeLong and A. A. Yayanos : *Appl Environ Microbiol*, **51**, 730 (1986).
- 33) J. Kawamoto, T. Sato, K. Nakasone, C. Kato, H. Mihara, N. Esaki and T. Kurihara : *Environ Microbiol*, **13**, 2293 (2011).
- 34) E. E. Allen, D. Facciotti and D. H. Bartlett : *Appl Environ Microbiol*, **65**, 1710 (1999).
- 35) C. Kato, T. Sato and K. Horikoshi : *Biodiv Conserv*, **4**, 1 (1995).
- 36) C. Kato, A. Ikegami, M. Smorawinska, R. Usami and K. Horikoshi : *J Mar Biotechnol*, **5**, 210 (1997).
- 37) K. Nakasone, A. Ikegami, C. Kato, R. Usami and K. Horikoshi : *Extremophiles*, **2**, 149 (1998)
- 38) M. J. Merrick and R. A. Edwards : *Microbiol Rev*, **59**, 604 (1995).
- 39) A. Ikegami, K. Nakasone, C. Kato, Y. Nakamura, I. Yoshikawa, R. Usami and K. Horikoshi : *FEMS Microbiol Lett*, **192**, 91 (2000).
- 40) K. Nakasone, A. Ikegami, H. Kawano, R. Usami, C. Kato and K. Horikoshi : *Extremophiles*, **6**, 89 (2002).
- 41) A. Ikegami, K. Nakasone, M. Fujita, S. Fujii, C. Kato, R. Usami and K. Horikoshi : *Biochim Biophys Acta*, **1491**, 315 (2000).
- 42) A. J. Ninfa, L. J. Reitzer and B. Magasanik : *Cell*, **50**, 1039 (1987).
- 43) A. Ikegami, K. Nakasone, C. Kato, R. Usami and K. Horikoshi : *Biosci Biotech Biochem*, **64**, 915 (2000).
- 44) R. K. Poole, H. D. Williams, A. Downie and F. Gibson : *J Gen Microbiol*, **135**, 1865 (1989).
- 45) R. K. Poole, L. Hatch, M. W. J. Cleeter, F. Gibson, G. B. Cox and G. Wu : *Mol Microbiol*, **10**, 421 (1993).
- 46) R. K. Poole, F. Gibson and G. Wu : *FEMS Microbiol Lett*, **117**, 217 (1994).
- 47) C. Kato, H. Tamegai, A. Ikegami, R. Usami and K. Horikoshi : *J Biochem*, **120**, 301 (1996).
- 48) H. Tamegai, C. Kato and K. Horikoshi : *J Biochem Mol Biol Biophys*, **1**, 213 (1998).
- 49) H. Tamegai, H. Kawano, A. Ishii, S. Chikuma, K. Nakasone and C. Kato : *Extremophiles*, **9**, 247 (2005).
- 50) M. Yamada, K. Nakasone, H. Tamegai, C. Kato, R. Usami and K. Horikoshi : *J Bacteriol*, **182**, 2945 (2000).
- 51) M. H. Qureshi, C. Kato and K. Horikoshi : *Extremophiles*, **2**, 93 (1998).
- 52) M. H. Qureshi, C. Kato and K. Horikoshi : *FEMS Microbiol Lett*, 161, 301 (1998).
- 53) R. E. Marquis : *Adv Microb Physiol*, **14**, 159 (1976).
- 54) A. Ishii, T. Sato, M. Wachi, K. Nagai and C. Kato : *Microbiology*, **150**, 1965 (2004).
- 55) A. Ishii, K. Nakasone, T. Sato, M. Wachi, M. Sugai, K. Nagai and C. Kato : *J Biochem*, **132**, 183 (2002).
- 56) H. Kawano, K. Nakasone, M. Matsumoto, R. Usami, C. Kato, F. Abe : *Extremophiles*, **8**, 367 (2004).
- 57) E. Ohmae, K. Kubota, K. Nakasone, C. Kato and K. Gekko : *Chem Lett*, **33**, 798 (2004).
- 58) K. Venkateswaran, D. P. Moser, M. E. Dollhopf, D. P. Lies, D. A. Saffarini, B. J. MacGregor, D. B. Ringelberg, D. C. White, M. Nishijima, H. Sano, J. Burghardt, E. Stackebrandt and K. H. Neilson :

Int J Syst Bacteriol, **49**, 705 (1999).

- 59) L. M. I. De Poorter, Y. Suzaki, T. Sato, H. Tamegai and C. Kato : *Mar Biotechnol*, **6**, s190 (2004).
- 60) D. H. Bartlett : *J Molec Microbiol Biotechnol*, **1**, 93 (1999).
- 61) T. Nagae, T. Kawamura, L. M. G. Chavas, K. Niwa, M. Hasegawa, C. Kato and N. Watanabe : *Acta Cryst*, **D68**, 300 (2012).