

特集：極限環境で働くタンパク質の特徴と利用

深海微生物の作る酵素の特徴

加藤 千明

深海という環境は、その大部分が恒常的な低温、高水圧下の状態におかれている環境である。従って、そうした環境に適応している微生物（深海微生物）は、その生産する酵素がそうした環境条件でもよく働くことが必須条件となっている。本稿では、深海微生物、なかんずく好圧性微生物が作る各種酵素タンパク質の圧力下での挙動を総括し、一般的に好圧菌の作る酵素は大気圧下に適応した微生物の作る酵素に比べ圧力耐性が高いことを示唆した。こうした酵素の圧力耐性はタンパク質構造からくる特質に関わっている可能性が考えられ、深海微生物の作る酵素の特徴を明らかにするために、今後タンパク質構造—圧力活性相関の研究を更に進めていかなければならない。

1. はじめに

深海という環境は、私どもの惑星「地球」という環境の中の実に多くの部分を占めている。すなわち、地球表層の約70%が海洋であり、その海洋環境の95%以上の部分が深度1,000m以上の深海環境であるということはよく知られている。従って、深海底に生息する生き物たちは地球生命圏で最も多量に存在する生物であるといってもよく、深海環境の一般的な特徴でもある「低温、高圧下」といった条件で生息している生物が、この惑星に最もよく適応した生命体であると考えられる。深海生命体についての知見は、前世紀後半に報告された海底熱水鉱床生物圏の発見以来、探索技術の発展によって現在急速に増加しつつある。しかしながら、広く海洋底に広がる深海生命圏の総合的な理解についてはまだまだ不明な点が多い。今後、深海生態系の解明から個々の深海生物に対する理解、そしてこうし

た生物の作る酵素、タンパク質、膜といった分子的な知見を深めるために更なる深海研究の進展が必要である。

深海高水圧環境に適応して生息する微生物の作る酵素タンパク質は、その水深に応じた環境圧力下でも良好に働いていることが理解されている。しかしながら、一般的に、タンパク質に圧力をかけると体積変化に依存した構造の変化が起こり、その結果として多くの場合その活性が阻害され、さらに高い圧力下では失活することが知られている¹⁾。ということは、こうした深海微生物の作るタンパク質は、大気圧下に適応した微生物のそれと比較して、高圧力環境に対して耐性を持っていると考えられる。残念ながら、こうした圧力耐性とタンパク質の構造との相関に関しては今日まで研究例が少なく、どういった構造的な特徴が圧力耐性に効いているのかについては、まだ一般則は出されていない。

一方、近年における深海調査研究の進展から、高水圧環境に適応して生息している深海微生物、なかんずく好圧性微生物（以下、好圧菌）に関する知見が蓄積し、それらのゲノム解析も行われ^{2,3)}、こうした深海微生物の作る酵素タンパク質の情報も飛躍的に増大してきている。これらの酵素は高圧環境に適応した構造を持つと考えられ、これと大気圧下に適応した微生物の相同酵素とを比較することにより、タンパク質の耐圧性に関するメカニズムが解明されることが期待されている。本稿では、これまで筆者らの研究室で取り組んできた好圧菌 *Shewanella violacea* DSS12 株

独立行政法人海洋研究開発機構、海洋・極限環境生物圏領域、海洋生物多様性研究プログラム（〒237-0061 神奈川県横須賀市夏島町 2-15）

Features of the enzymes produced by the deep-sea microorganisms

Chiaki Kato (Marine Biodiversity Research Program, Institute of Biogeosciences, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology, 2-15 Natsushima-cho, Yokosuka, Kanagawa 237-0061, Japan)

の作る酵素タンパク質の圧力適応機構に関する知見を中心にまとめた。

2. 好圧菌の多様性とモデル微生物 *Shewanella violacea* DSS12

好圧菌は深度約 2,500m を超える深海底から幅広く分離されてきており、その多くが海洋性細菌が多く含まれているガンマプロテオバクテリアグループに含まれている (図 1)。好圧菌は、主に *Shewanella*, *Photobacterium*, *Colwellia*, *Moritella*, および *Psychromonas* の 5 属に含まれ、これまで 11 種が報告され、一般的に好冷性で不飽和脂肪酸を多く含む等の特徴を有する⁴⁾。 *Shewanella violacea* DSS 12 株は、琉球海溝深度 5,110m から得られた深海底泥から分離されたバクテリア (図 2) で、その生育至適条件が 8°C, 30MPa である好冷好圧菌である⁵⁾。本菌は好圧菌であるにも関わらず、大気圧下から 70MPa までの高圧下まで良好に生育でき、種々の圧力条件下での遺伝子発現のメカニズムを解析するためのモデル微生物として利用されてきている⁶⁾。以下に、本菌で研究がなされてきたいくつかの酵素・タンパク質の特徴について記述する。

3. 好圧菌の酵素・タンパク質の特徴

3.1 細胞分裂タンパク質 FtsZ

微生物にとって細胞分裂タンパク質 FtsZ の機能発現は、その生育に必須である。大気圧に適応した大腸菌を高圧条件下 (40~50MPa) で培養すると細胞の伸張が見られるが、これは圧力により FtsZ タンパク質のリング形成の阻害が起こるためである⁷⁾。一方 *S. violacea* の場合、こうした高圧条件下でも FtsZ リング形成の阻害が起こらず、良好に細胞分裂が起こることが観察されている (図 3)。FtsZ のアミノ酸一次構造を本好圧菌と大腸菌をはじめとする大気圧下に適応した微生物とで比較すると、GTPase 活性ドメインを含む N 端側が非常に高く保存されているのに対し、リング形成に重要な役割を担う C 端側に大きな違いが見られており、こうした違いが高圧下での FtsZ リング形成の機能に深く関わっている可能性が示唆されている⁸⁾。

3.2 ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR)

DHFR はジヒドロ葉酸 (DHF) を還元してテトラヒドロ葉酸 (THF) を作る酵素で、この反応でできる THF がプリン核酸やアミノ酸合成のための重要なコファクターで

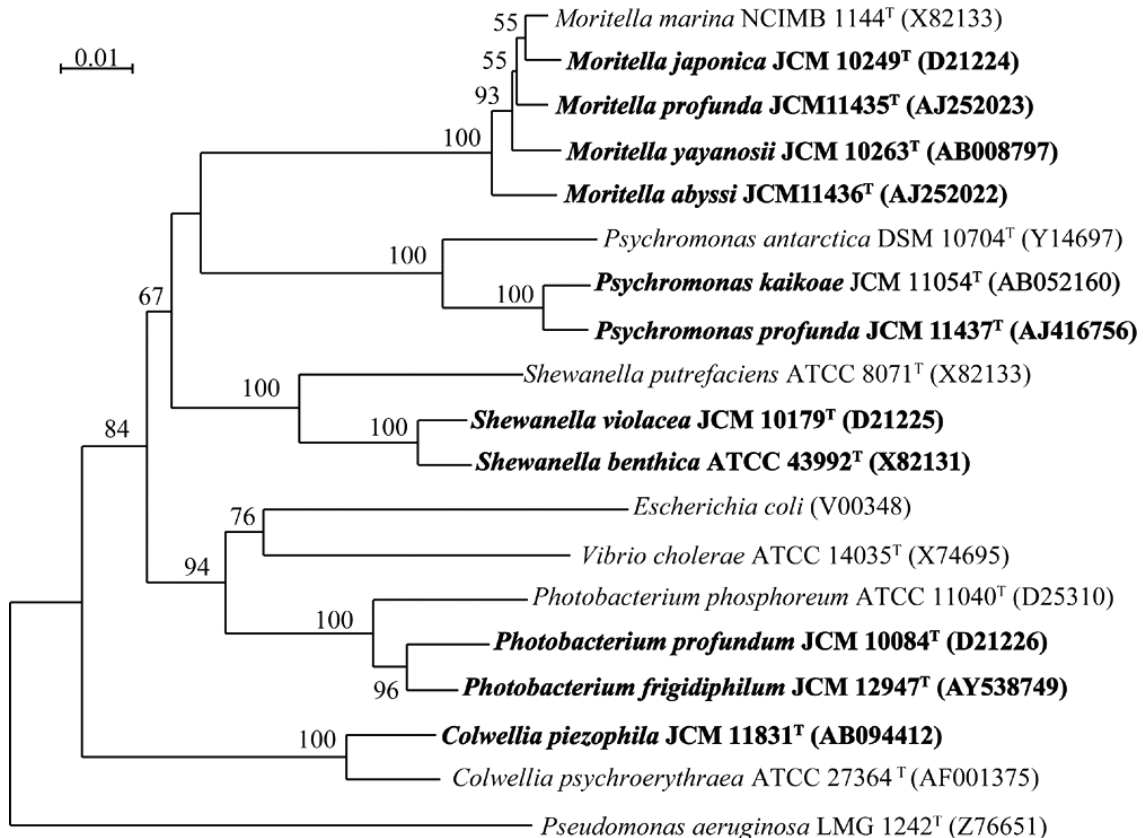


図 1 好圧菌の系統樹

深海底から分離された好圧菌の多様性を 16S rDNA 遺伝子の塩基配列に基づいた進化系統樹で示した。好圧菌 11 種は太字で示した。

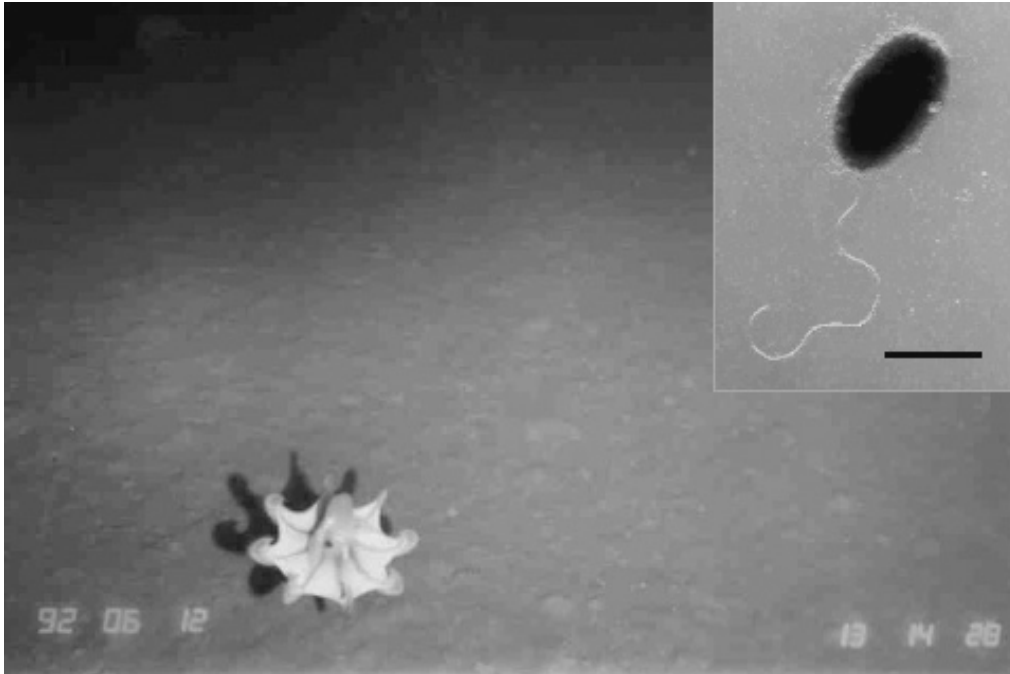


図2 琉球海溝深度5,110mの海底(24°15.23'N, 126°47.30'E)を撮った写真と分離された好圧菌, *Shewanella violacea* DSS12, の電子顕微鏡写真(バーは2 μ m)
海底写真の中央下部に移っているのは深海性タコである。

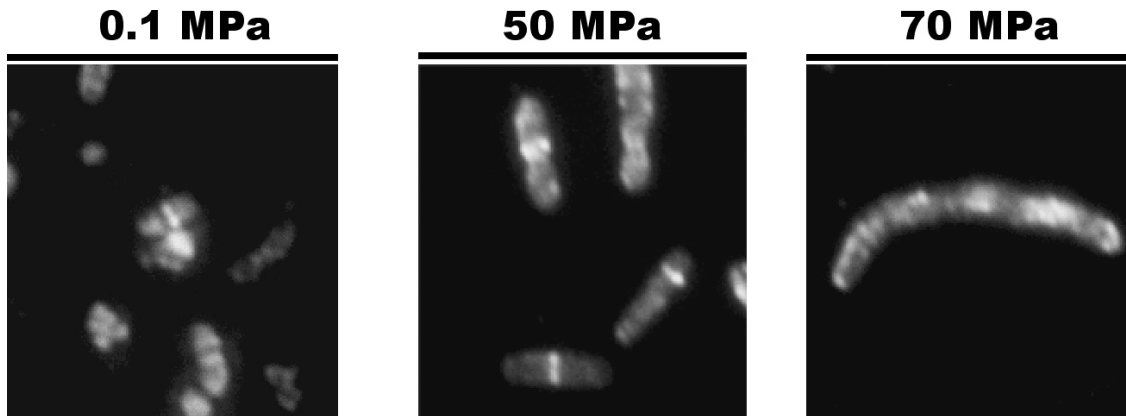


図3 各圧力下における *S. violacea* の FtsZ リングの観察
FtsZ タンパク質は, 抗体による免疫蛍光染色法により染色した. 50MPa までは良好にリング形成が観察されたが, 生育限界圧力である 70MPa では, リング形成が阻害を受けていた.

あるため, あらゆる生物に必須の酵素であることが知られている. *S. violacea* と大腸菌の DHFR の活性を各圧力条件下で測定したところ, 大腸菌の酵素が加圧に伴い失活していくのに対し, *S. violacea* のものは逆に 100MPa 程度まで活性が上昇し, これを超えた圧力でようやく活性が落ちていく様子が確認された(図4).

一般的に酵素タンパク質において, 活性中心に基質が結合した時にそのタンパク質全体の体積が変化するが, このときの体積変化量を「活性化体積」という. 圧力条件は, 常に物質の体積を減少させる方向にはたらくので, 活性化

体積が負の場合は, その酵素活性を促進させる効果がある. なお, 活性化体積の計算法に関しては文献⁹⁾を参照されたい.

好圧菌の DHFR の活性化体積を測定すると, 0.1~100 MPa の範囲で -5.8 ± 0.8 ml/mol となり, 遷移状態において体積が減少するので, 上に述べた理由により酵素活性が上昇する. このような圧力による活性化促進効果は, 本好圧菌の生育環境(深海, 高水圧下)を考えると興味深い⁹⁾. ちなみに大腸菌の DHFR の活性化体積変化は $+8.1 \pm 0.8$ ml/mol で, 遷移状態において体積が増加するので, 加圧

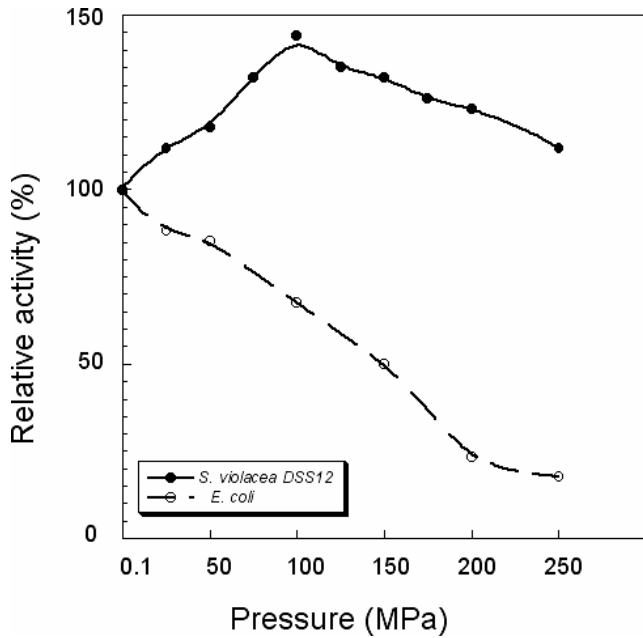


図4 好圧菌 *S. violacea* と大腸菌 *E. coli* 由来のジヒドロ葉酸還元酵素の各圧力下での活性プロファイル
好圧菌の酵素は100MPaにおいて最も高い活性が認められた。

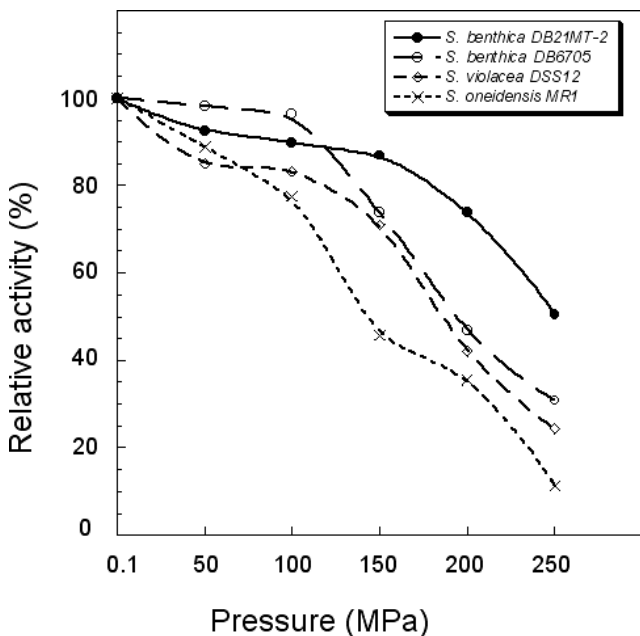


図5 *Shewanella* 属細菌のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の各圧力下での活性プロファイル

好圧性 *Shewanella* 属細菌 (*S. benthica*, *S. violacea*) の酵素は、大気圧に適応している細菌、*S. oneidensis* の酵素と比較して、概して耐圧性が高い。なかんずくマリアナ海溝底から分離された絶対好圧菌 *S. benthica* DB21MT-2 において、最も高い耐圧性が見られた。

により活性が低下する傾向を裏付けた。

3.3 イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素 (IPMDH)

IPMDH はロイシン生合成系の鍵酵素であり、多くの微生物においてその存在が確認されており、立体構造学的な知見も豊富なタンパク質の一つである。ここでは、*S. violacea* を含む各種の *Shewanella* 属細菌から IPMDH を調製し、その活性と圧力条件との相関に関して測定を行った¹⁰⁾。*S. oneidensis* は大気圧下に適応した菌で、*S. benthica* DB6705 および *S. benthica* DB21MT-2 はそれぞれ日本海溝深度 6,356m、マリアナ海溝深度 10,989m より分離された好圧菌である。その結果、大気圧下に適応している *S. oneidensis* の IPMDH において顕著な圧力感受性が見られ、マリアナ海溝から分離された絶対好圧菌 (大気圧下では全く生育できない好圧菌) の酵素では、200MPa の条件でも大気圧下の条件と比較してその 8 割近い活性が保持され、高度な耐圧性を示すことがわかった (図 5)。

3.4 RNA ポリメラーゼ

RNA ポリメラーゼは DNA を鋳型として RNA を転写する、生物にとって必須の重要酵素であり、バクテリアの場合、DNA 上のプロモーター部位を認識する σ サブユニットと転写活性を有する β , β' , α サブユニット複合体とからなる複雑な構造を持った酵素である。一般的にこうした複雑な構造を持つ酵素は加圧に対して感受性が高いと予想されるが、これまでの知見から、好圧菌は加圧に应答して転写するメカニズムを有していることがわかっている⁹⁾。したがって、好圧菌の RNA ポリメラーゼには圧力耐性があり、高圧条件下でもよく働く仕組みが存在することが示唆されている。そこで、こうした複雑な構造を持つタンパク質の圧力下での挙動を解析するために、筆者らは高圧電気泳動装置 (HPEA; High Pressure Electrophoresis Apparatus) を開発した¹¹⁾。この装置は、タンパク質の電気泳動をかける前・中・後に一貫して加圧状態を付加することができるもので、加圧下でのタンパク質の会合・分離を直接的に検出することが可能である (図 6)。HPEA を用いて大腸菌と *S. violacea* との RNA ポリメラーゼの 140MPa における構造の安定性について実験した結果、大腸菌では加圧下において RNA ポリメラーゼの各サブユニットが解離していることが示されたが、*S. violacea* では、140MPa の条件でも安定に構造が保持されていた。こうした加圧下での構造保持にはプロモーター認識部位である σ サブユニットの存在が不可欠であり、四つのサブユニットがまとまって好圧菌の高圧下での安定性を維持していることが明らかとなった¹¹⁾。

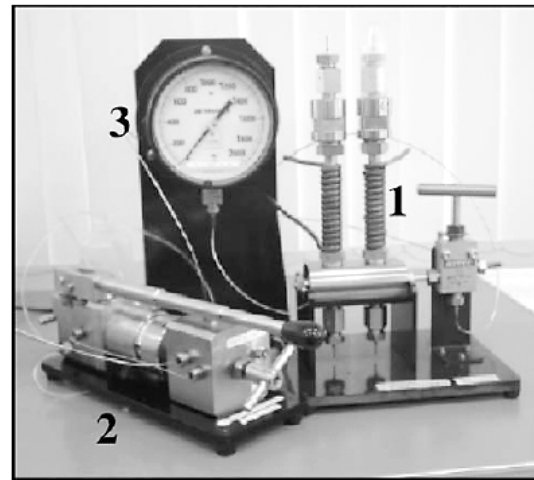
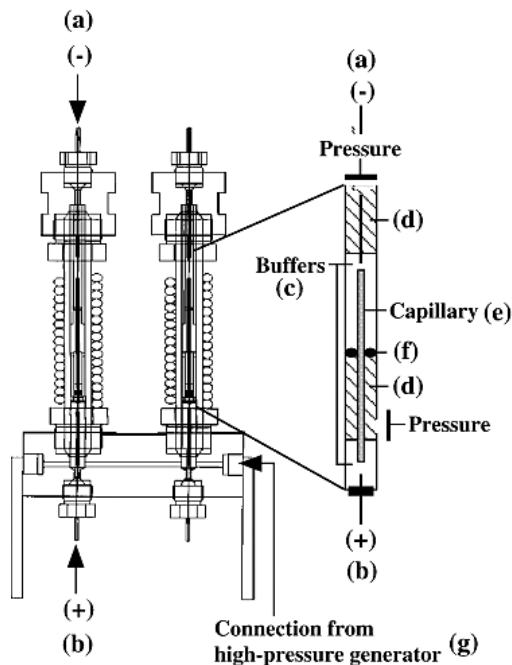


図6 高圧電気泳動装置

1. 高圧電気泳動チャンバー．左にその中味の概略図を示した．キャピラリーチューブの中にポリアクリルアミドゲルを作成し，加圧状態で電気泳動がかけられる．
a, 陰極側電極．b, 陽極側電極．c, 泳動用バッファ．d, シリコンオイル．e, キャピラリーゲル．f, Oリング．
2. 加圧ポンプ．圧力媒体としてシリコンオイルを使っている．水溶性のサンプルが拡散しないようにするためである．
3. 圧力ゲージ．

4. 高圧適応したタンパク質の構造

これまで述べた四つのタンパク質から，その構造的な知見が蓄積している IPMDH と RNA ポリメラーゼ・ σ サブユニットに関して，推定される三次元立体構造を比較した．IPMDH では，大気圧下に適応している *S. oneidensis* と絶対好圧菌の *S. benthica* DB21MT-2, 好圧菌 *S. violacea* などの酵素の比較を行い，また σ サブユニットでは，大気圧下に適応している大腸菌，*S. oneidensis* のものと好圧菌 *S. violacea* との比較を行った．その結果，興味深いことに大気圧下に適応したタンパク質において，その表層に存在するループ構造が β ストランド構造に置き換わっているということが，これら二つのタンパク質の場合に共通してみられた¹²⁾ (図7)．こうした構造の違いがタンパク質の圧力耐性にどのように寄与しているのかは今後の解析を待たねばならないが，タンパク質の耐圧性を付与する構造が好圧菌を利用することにより見いだされる可能性を示唆している．

5. おわりに

高圧下における生物の挙動は，近年急速にその研究が進展しており，Abe らにより「圧力生理学，Piezophysiology」

という研究分野が提唱されている¹³⁾．圧力生理学というのは，生きた細胞や生物体そのものに圧力を加えそのレスポンスを解析することにより，今までわかっていない新たな生物現象を解明しようとするものである．こうした分野の最近の進捗状況については Abe の総説¹⁴⁾に詳しい．本稿にて記述したタンパク質の圧力耐性に関する研究もこうした分野で進展してきたが，元々高水圧環境に適応して生息している深海生物を材料としたタンパク質の構造と機能に関する研究例はまだそれほど多くはない．深海の生き物は，その長い深海環境に対する適応戦略の中で，その生育に必須の機能を有するタンパク質を耐圧性に作り替えてきていることが推定され，今後ますますこうした生物を材料とした研究が圧力研究の中で重要な位置を占めていくであろう．

今回，高圧適応した二つの異なるタンパク質において，表層のループ構造が β ストランドに置き換わっていることを指摘した．このことから，高圧環境下では β ストランド構造がより安定である可能性が考えられ，タンパク質表面の局所構造が全体の安定性や機能に重要であることが示された意義は大きい．こうした構造の変化が，好圧性微生物の有するタンパク質の耐圧化戦略の一般則であるか否かは今後のより広範な知見を待たねばならないが，体積変

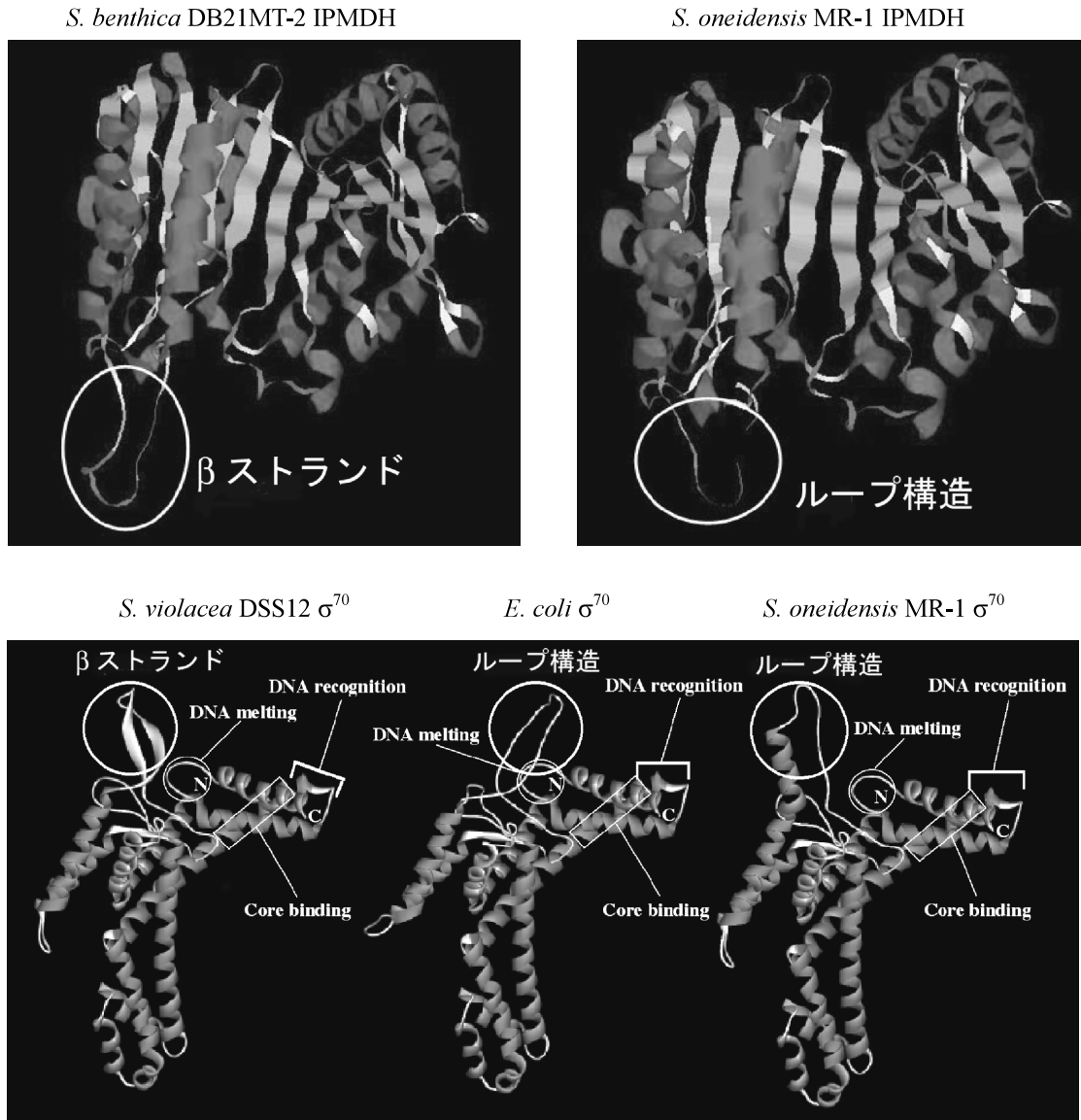


図7 好圧菌、及び常圧菌のIPMDHならびに σ^{70} サブユニット構造の比較
両タンパク質共に、好圧菌由来のものではループ構造か β ストランド構造への変化が観察された。

化とタンパク質の安定性との相関が垣間みられたようで非常に興味深い。今後、タンパク質の構造活性相関をターゲットとした研究のためにますます好圧菌が利用されていくであろう。実際に筆者らと構造解析のグループとの共同研究も進展中で、タンパク質の耐圧性を解き明かす研究がますます進んでいくことが期待されている。

謝辞

本稿を執筆するに際し、有益なご助言をいただいた本機構の阿部文快博士・佐藤孝子博士に謝意を表します。また、好圧菌研究ネットワークの仲宗根薫博士(近畿大学)・為我井秀行博士(日本大学)・大前英司博士(広島大学)の共同研究の熱意に甚々の謝意を表します。

文 献

- 1) Heremans, K. & Smeller, L. (2001) in *Biological Systems Under Extreme Conditions, Structure and Function* (Taniguchi, Y., Stanley, H.E., & Ludwig, H. eds.), pp. 53-73, Biological and Medical Physics Series, Springer-Verlag, Heidelberg.
- 2) 仲宗根薫, 森 浩禎, 馬場知哉, 加藤千明 (2003) *化学と生物*, 41, 92-98.
- 3) Vezzi, A., Campanaro, S., D'Angelo, M., Simonato, F., Vitulo, N., Lauro, F.M., Cestaro, A., Malacrida, G., Simionati, B., Cannata, N., Romualdi, C., Bartlett, D.H., & Valle, G. (2005) *Science*, 307, 1459-1461.
- 4) Kato, C., Nogi, Y., & Arakawa, S. (2008) in *High-Pressure Microbiology* (Michiels, C., Bartlett, D.H., & Aertsen, A. eds.), pp. 203-217, ASM press, Washington DC.

- 5) Nogi, Y., Kato, C., & Horikoshi, K. (1998) *Arch. Microbiol.*, **170**, 331–338.
 - 6) Nakasone, K., Ikegami, A., Kawano, H., Usami, R., Kato, C., & Horikoshi, K. (2002) *Extremophiles*, **6**, 89–95.
 - 7) Ishii, A., Sato, T., Wachi, M., Nagai, K., & Kato, C. (2004) *Microbiology*, **150**, 1965–1972.
 - 8) Ishii, A., Nakasone, K., Sato, T., Wachi, M., Sugai, M., Nagai, K., & Kato, C. (2002) *J. Biochem.*, **132**, 183–188.
 - 9) Ohmae, E., Kubota, K., Nakasone, K., Kato, C., & Gekko, K. (2004) *Chem. Lett.*, **33**, 798–799.
 - 10) De Poorter, L.M.I., Suzuki, Y., Sato, T., Tamegai, H., & Kato, C. (2004) *Mar. Biotechnol.*, **6**, S190–194.
 - 11) Kawano, H., Nakasone, K., Matsumoto, M., Usami, R., Kato, C., & Abe, F. (2004) *Extremophiles*, **8**, 367–375.
 - 12) Kato, C., Sato, T., Abe, F., Ohmae, E., Tamegai, H., Nakasone, K., Siddiqui, K.S., & Thomas, T. (2008) in *Protein Adaptation in Extremophiles. Molecular Anatomy and Physiology of Proteins Series* (Thomas, T. & Siddiqui, K.S. eds.), pp. 167–191, Nova Science Publisher, New York.
 - 13) Abe, F. & Kato, C. (1999) in *Extremophiles in Deep-Sea Environments* (Horikoshi, K. & Tsujii, K. eds.), pp. 227–248, Springer-Verlag, Tokyo.
 - 14) Abe, F. (2007) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2347–2357.
-