

超好熱菌の高温適応戦略

佐藤 喬章*・跡見 晴幸

はじめに

海底火山付近に存在する熱水噴出孔や陸上温泉などのヒトや動物は住めないような高温環境にも“超好熱菌”と呼ばれる微生物が生育していることが1980年頃から明らかになっている。その後この超好熱菌の研究が進みその生命機構についても多くのことが明らかになってきている。本稿では超好熱菌が高温環境に適応するために用いているユニークな仕組みを概説していきたい。

超好熱菌とは

超好熱菌とは至適生育温度が80°C以上の微生物の総称である。その多くが真核生物やバクテリアとは異なる第三の微生物群であるアーキアに属している(図1)。図1の進化系統樹において太線で示した超好熱菌はいずれも系統樹の根の近傍に位置している。また、生命が誕生した原始の地球環境は高温で嫌氣的という現在の超好熱菌が好む生育環境に似ていると予測されている。さらに、超好熱菌の遺伝子数は一般的に2千程度とヒト、酵母、大腸菌(それぞれ2万, 6千, 4千程度)と比べて少なく、単純な生命機構を有していると考えられる。これら3つ

の理由から超好熱菌は原始生命体に近い存在と考えられており、生命の進化を考える上で興味深い研究対象であるといえる。また、polymerase chain reaction (PCR) に使用されるDNA polymeraseに代表されるように、超好熱菌由来の耐熱性酵素の利用も大いに期待されているところである。

高温環境に適応している分子について

さて、超好熱菌が生育している80°C以上という温度域では、我々ヒトや動物はとても生きていけないだろう。なぜ生きていけないかという理由を少し化学的に考えてみると、最初に思い当たるのはタンパク質の変性ではないだろうか。卵を高温にしてゆでるとタンパク質が変性・凝集してゆで卵になってしまい元には戻らない、ということを経験した方は多いだろう。逆に考えると、超好熱菌のタンパク質はすべてこのような高温環境でも変性して機能を失わないような仕組みを持っているのである。

また、タンパク質だけでなく、膜成分や生命の設計図であるゲノムDNAなどを含め超好熱菌を構成する物質はすべて高温でも変性しないか、少なくとも生育していける程度には維持されていることになる。さらには、補酵素や代謝中間体の中には熱に弱い化合物もあると考えられるが、それらが高温にさらされても致命的な状況にはならないような工夫があるはずである。また、ここで少し注意したいのは、高温という極限環境は生物にとってみると高塩濃度や強酸性/強アルカリ性とは少し違う。塩・酸・塩基といったものについては効率よく細胞外へと排出する仕組みがあれば細胞内ではそれらの濃度を低く保つことが可能である。しかしながら、ここで取り上げる温度については細胞内から取り除くことはできないので細胞内成分は否応なしにすべて高温環境にさらされているという面で他のパラメーターとは少し異なる。

本稿では、超好熱菌のタンパク質、ゲノムDNA、膜脂質および代謝中間産物の高温適応戦略を中心に概説する。

タンパク質の高温適応戦略

まずはタンパク質の高温適応から見ていきたいと思

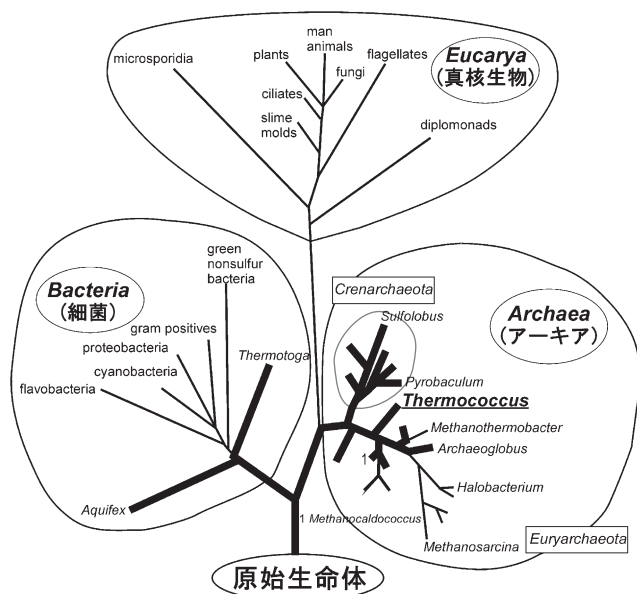


図1. 16S/18S rRNAの配列を基にした生物の進化系統樹

* 著者紹介 京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻(助教) E-mail: takaakisato@sbchem.kyoto-u.ac.jp

う。さまざまなタンパク質のアミノ酸配列について、超好熱菌、好熱菌、常温菌由来のものを比較すると、(超)好熱菌ではAsn, Asp, Cys, GlnおよびSerの割合が常温菌に比べると低く、逆にArg, GluおよびValの割合が高いという特徴があることが分かっている¹⁾。荷電性アミノ酸のGluやArgが形成するイオン結合が高温環境におけるタンパク質の安定化に寄与していると考えられている。このような傾向がよく分かるタンパク質の具体例として、誤って修飾されてしまったguanineのメチル基を除去するDNA修復酵素のO⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)があげられる。超好熱菌の1種である*Thermococcus kodakarensis*由来のMGMT (*Tk*-MGMT)については結晶構造が明らかとなっている²⁾。また、大腸菌由来のadaptive response regulatory proteinのC末端側のdomain (AdaC)はmethyltransferase活性を示し、MGMTに相当すると考えられているが、この結晶構造も解明されている³⁾。これらの結晶構造を比較すると、*Tk*-MGMTの分子表面にはAdaCと比べてより多くの荷電性のアミノ酸残基がイオン結合を形成していることが分かっている。また、*Tk*-MGMTにおいては α -helix内や2つの α -helix間にイオン結合性相互作用が多いことも分かっている。これらのイオン結合が*Tk*-MGMTの高い耐熱性に寄与していると考えられている²⁾。さらに、AdaCと比べて*Tk*-MGMTは分子内部により多くの芳香族アミノ酸を含み、疎水性相互作用の増強により熱安定性が向上していると考えられている。

また、4次構造により耐熱性が向上する例も知られている。Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco)はribulose 1,5-bisphosphate, 二酸化炭素と水から2分子の3-phosphoglycerateを生成する反応を触媒し、植物や藍藻などではカルビン回路における鍵酵素である。アーキアでは最近本酵素が核酸やヌクレオシド分解に関わることが明らかとなった^{4,5)}。Rubiscoは1次構造から3つのtypeに分類されるが、もっとも一般的な植物などが有するtype IのRubiscoはlarge subunit (L)が8つとsmall subunit (S)の8つからなるL₈S₈ ((L₂)₄S₈)のヘテロ16量体構造をとる。一方、主に光合成細菌が有するtype IIはL₂の2量体構造をとる。それらに対してアーキアが有するtype IIIの内*T. kodakarensis*由来のRubisco (*Tk*-Rubisco)は(L₂)₅の10量体構造を形成する。4次構造を形成するアミノ酸残基の変異体を作製すると10量体構造が崩れL₂構造となり、耐熱性が低下することが明らかとなっている⁶⁾。つまり、この4次構造も熱安定性に寄与していると考えられる。

ゲノムDNAの高温適応戦略

生命の設計図とも言えるゲノムDNAも高温環境では変性して2本鎖に解離しやすい。ゲノムの安定化に寄与し得るものとしてまず思いつくのはGCペアによる二重らせんの安定化ではないだろうか。GCペアはATペアよりも水素結合の数が多く結合力が強いので、GC含量が高いゲノムはより安定であるといえる。しかしながら、ゲノム解析が進むにつれて超好熱菌はGC含量を高くすることによりゲノムを安定化しているわけではないことが明らかとなった(表1)。たとえば、103°Cでも生育できる超好熱菌*Pyrococcus furiosus*のGC含量は半分にも満たない41%である。超好熱菌よりもむしろ好塩菌のGC含量が高いことが知られている。

では、超好熱菌ではどのようにしてゲノムDNAが安定化されているのだろうか? その1つにreverse gyraseによる安定化があげられる。Reverse gyraseはATP依存的なDNA topoisomeraseの1つで、普通のDNA gyraseが環状ゲノムDNAの負のsupercoil構造をもたらしすのに対し、正のsupercoil構造を誘導する。イメージとしては、reverse gyraseがDNA構造の巻き数を増やすことにより2重らせんの2本の鎖が互いにほどけにくい方向に働いていると考えられる。

またこのreverse gyraseは超好熱菌特異的な遺伝子として有名である。バクテリア、アーキアに関係なく超好熱菌に分類される微生物はすべてこのreverse gyraseを有している。意外なことに超好熱菌特異的な遺伝子はこのreverse gyraseのみであると言っても過言ではない。よって、この遺伝子が超好熱菌が高温環境で生育することを可能にしていると考えられてきた。この遺伝子の破壊株の解析により実際にreverse gyraseが85°Cや93°Cといった高温環境での生育において重要な役割を担っていることが示されている⁷⁾。

また、ヒストンやポリアミンによるゲノムDNAの安定化についても示唆されている。ヒストンは真核生物においてよく研究されているゲノムDNAを折りたたんで核内に収納しているタンパク質である。アーキアのEuryarchaeota門には真核生物のヒストンと1次構造が似ているヒストン様タンパク質が存在する。このヒストン様タンパク質によりDNAの変性解離温度が20°C以上も上昇することが報告されている。また、ポリアミン類や高濃度のK⁺イオンも同様の効果があることが示唆されている⁸⁾。

表1. 超好熱菌のゲノムのGC含量と生育温度

ドメイン	門/目	種	GC含量	生育温度
Archaea	CRENARCHAEOTA			
	Desulfurococcales	<i>Aeropyrum pernix</i>	56	70–100
		<i>Desulfurococcus kamchatkensis</i>	45	85
		<i>Hyperthermus butylicus</i>	54	95–108
		<i>Ignicoccus hospitalis</i>	57	70–98 (90)
		<i>Ignisphaera aggregans</i>	36	92
		<i>Pyrolobus fumari</i>	55	106
		<i>Staphylothermus marinus</i>	36	92
		<i>Thermosphaera aggregans</i>	47	85
	Sulfolobales	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	36	50–87
		Thermoproteales	<i>Caldivirga maquilingensis</i>	43
	<i>Pyrobaculum calidifontis</i>		57	90–95
	<i>Thermoproteus tenax</i>		55	86
	<i>Vulcanisaeta distributa</i>		45	90
	EURYARCHAEOTA			
Archaeoglobales	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	49	60–95	
Methanobacteriales	<i>Methanothermus fervidus</i>	32	83	
Methanococcales	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	31	85	
Methanopyrales	<i>Methanopyrus kandleri</i>	61	80–101	
Thermococcales	<i>Pyrococcus furiosus</i>	41	70–103	
	<i>Thermococcus kodakarensis</i>	52	85	
NANOARCHAEOTA	<i>Nanoarchaeum equitans</i>	32	70–90	
KORARCHAEOTA	<i>Korarchaeum cryptofilum</i>	49	74–93	
Bacteria	AQUIFICAE			
	Aquificales	<i>Aquifex aeolicus</i>	43	96
	THERMOTOGAE			
Thermotogales	<i>Thermotoga maritima</i>	46	80	

膜脂質の高温適応戦略

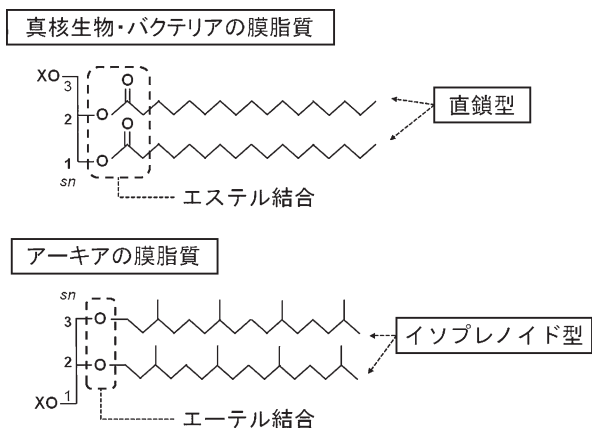


図2. 各ドメインの膜脂質の構造

アーキアの大きな特徴の1つとして、真核生物やバクテリアとは異なる特有の膜脂質がある。真核生物やバクテリアでは脂肪酸由来の直鎖の炭化水素がグリセロールとエステル結合で繋がっている。一方、アーキアの膜脂質では枝分かれ構造を持つイソプレノイドがグリセロールとエーテル結合で結合している(図2)。エーテル結合はエステル結合に比べて化学的に安定であり高温環境においても結合が切断されにくいと考えられる。よって超好熱性アーキアの膜脂質が高温環境でも安定な理由の1つとしてこのエーテル結合があげられる。

先ほど紹介したアーキアにおける特有の膜脂質を archaeol と呼ぶが、膜脂質の成分として archaeol の他に

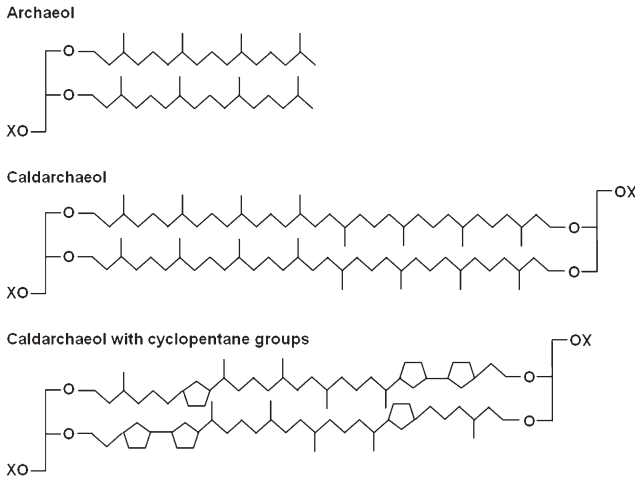


図3. アーキアの膜脂質

も archaeol が2つ繋がった構造を持つ caldarchaeol と caldarchaeol に cyclopentane が導入されたものもある (図3)。Crenarchaeota 門に属する *Acidilobus sulfurireducens* においては 65, 70, 75, 81°C と培養温度を上げていくにつれ caldarchaeol 中の cyclopentane の割合が増加することが分かっている⁹⁾。また Euryarchaeota 門に属する *T. kodakarensis* においては archaeol と caldarchaeol が膜脂質の主成分とされているが、培養温度を 60, 85, 93°C と上げていくにつれ caldarchaeol の割合が増加していくことが分かっている¹⁰⁾。これらはいずれも流動性のより低い膜脂質成分であることから膜をより強固で安定な状態にしていると考えられる。

代謝における高温適応戦略

代謝中間体の中には高温によって分解しやすい化合物も含まれる。たとえば、中央糖代謝における 1,3-bisphosphoglycerate (1,3-BPG) や fructose 1,6-bisphosphate (FBP) は熱で分解しやすいことが知られている。糖新生経路において fructose 6-phosphate (F6P) は dihydroxyacetone phosphate (DHAP) と glyceraldehyde 3-phosphate (GAP) から FBP を介して生産される。一般的にこの2つの反応は FBP aldolase (FBPald) および fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) という2つの異なる酵素によって触媒される (図4)。しかし、多くの超好熱菌ではこの2つの反応を1つの酵素 FBPase V/ FBPald が触媒している。これにより、FBP が生成するとすぐさま F6P に変換されることになり、酵素から解離して次の酵素に受け渡されている間の熱に曝される時間は短縮される (図4)。

一方、解糖系において 3-phosphoglycerate (3-PGA) は

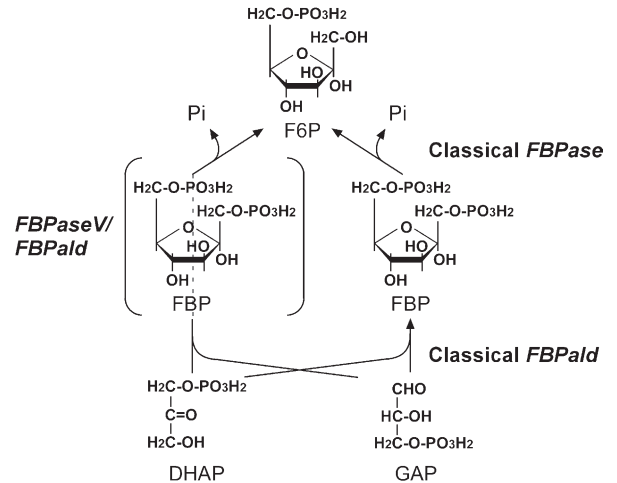


図4. FBPase V/ FBPald による F6P の合成. Pi: リン酸. その他の化合物や酵素の略称については本文に記載.

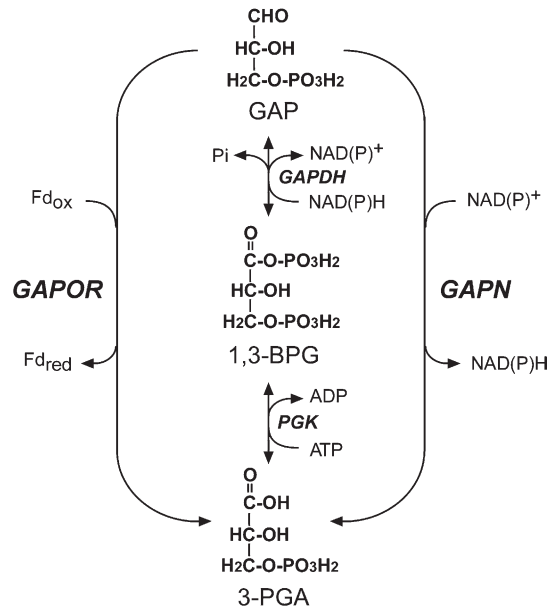


図5. バイパス経路による GAP からの 3-PGA 合成. Fd_{ox}: 酸化型フェレドキシン, Fd_{red}: 還元型フェレドキシン, Pi: リン酸. その他の化合物や酵素の略称については本文に記載.

GAP から 1,3-BPG を介して生成する (図5)。これも通常は GAP dehydrogenase (GAPDH) と 3-phosphoglycerate kinase (PGK) の2つの酵素によって触媒される。しかし、一部の超好熱菌では 3-PGA は GAP ferredoxin oxidoreductase (GAPOR) もしくは non-phosphorylating GAP dehydrogenase (GAPN) によって熱に弱い 1,3-BPG を介することなく GAP から直接合成される (図5)。このように代謝においても熱に弱い化合物のロスを避ける適応戦略が存在している。

高温ストレス応答

これまでに見てきたように超好熱菌はさまざまな戦略を用いて高温環境での生育を可能にしている。さらに、興味深いことに超好熱菌にもヒートショックレスポンスが存在する。つまり至適生育温度よりさらなる高温に曝された際に、その環境変化に対応するためのシステムが備わっているのである。自然の熱水噴出孔や陸上温泉の温度はいつも一定ではないと考えられるので、こういったシステムも生存に重要であると納得できる。これらのレスポンスは転写因子により誘導される¹¹⁻¹³⁾。

耐熱性タンパク質と進化について

超好熱菌の説明のところで述べた通り、生命は超好熱菌で誕生したという説がある。それが正しいとするとタンパク質の原型は高温環境でも変性せず機能するような仕組みを持っていたことになる。では、なぜその耐熱性が常温生物に進化していく過程で失われたのであろうか？これはタンパク質の剛直性と低温における酵素の回転数の関係にヒントがあるかもしれない。一般に耐熱性の高い酵素は常温環境では常温菌由来酵素よりも活性

が低い、これはタンパク質の剛直性が反応の回転に negative に働いていることが原因と考えられている。つまり耐熱性タンパク質は熱に対して安定な剛直性を持っているがゆえに常温での反応回転は低い。常温環境では回転数（活性）の高いものが選択されることから、剛直性を失った flexibility の高いタンパク質が優先的に選択され、結果として耐熱性が下がったとも考えられる。

文 献

- 1) Taylor, T. J. and Vaisman, I. I.: *BMC Struct. Biol.*, **10** Suppl 1, S5 (2010).
- 2) Hashimoto, H. et al.: *J. Mol. Biol.*, **292**, 707 (1999).
- 3) Moore, M. H. et al.: *EMBO J.*, **13**, 1495 (1994).
- 4) Sato, T. et al.: *Science*, **315**, 1003 (2007).
- 5) Aono, R. et al.: *Nat. Chem. Biol.*, **11**, 355 (2015).
- 6) Maeda, N. et al.: *J. Biol. Chem.*, **277**, 31656 (2002).
- 7) Atomi, H. et al.: *J. Bacteriol.*, **186**, 4829 (2004).
- 8) Higashibata, H. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **89**, 103 (2000).
- 9) Boyd, E. S. et al.: *Extremophiles*, **15**, 59 (2011).
- 10) Matsuno, Y. et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 104 (2009).
- 11) Kanai, T. et al.: *J. Biochem.*, **147**, 361 (2010).
- 12) Rohlin, L. et al.: *J. Bacteriol.*, **187**, 6046 (2005).
- 13) Vierke, G. et al.: *J. Biol. Chem.*, **278**, 18 (2003).