

解 説

超好熱菌の高温適応戦略

跡見 晴幸

京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻

(受取日：2021年2月19日，受理日：2021年3月8日)

How Hyperthermophiles Thrive in the Heat

Haruyuki Atomi

Department of Synthetic Chemistry and Biological Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University, Katsura, Nishikyo-ku, Kyoto 615-8510, Japan

(Received Feb. 19, 2021; Accepted Mar. 8, 2021)

Hyperthermophiles are organisms that display optimal growth temperatures of 80°C or higher. They thrive in a variety of hydrothermal environments. Hyperthermophiles occupy the most early-branching lineages in the phylogenetic tree of life, and are a focus of attention in terms of the origin and evolution of life. Hyperthermophiles display diversity in their mechanisms to conserve energy. The biomolecules of hyperthermophiles must function at extremely high temperatures, and this is made possible by unique structural features and/or interactions. Nucleic acids are stabilized by enzymes such as reverse gyrase and interactions with thermostable DNA-binding proteins or compounds including branched-chain polyamines. Proteins display structural adaptations that enable them to maintain their functional conformation at high temperatures. Hyperthermophiles from the archaea display much higher growth temperatures compared to their bacterial counterparts, and utilize membrane lipids not found in bacteria or eukaryotes. Metabolic enzymes and pathways are also designed to avoid unnecessary thermal degradation of labile intermediates. This article will provide an overview of the fascinating world of hyperthermophiles and the strategies that allow them to thrive at temperatures that would be lethal to any other organism.

Keywords: thermophiles, hyperthermophiles, archaea, extremophiles, thermostability

1. はじめに

古くから微生物は、常温・常圧・中性付近の pH といった我々と同様の環境を好むと考えられてきた。そのような、“穏和な環境”の中にも、これまでに多種多様な微生物が観察・分離され、その多様性が示されてきた。一方で、地球上には様々な“極限環境”，つまり温度・pH・圧力・塩濃度などが極端に高いあるいは低い環境が存在する。これらの極限環境には動物や植物は観察されず、見たところ生命は存在しないと考えられてきた。しかしながら1970年代頃から、このような環境にも、さらに多様な微生物が生息していることが明らかとなり、個々の環境に見事に適応した極限環境微生物 (extremophile) が次々と発見された。極限環境微生物は環境因子によって分類することができ、主なものとしては、好熱菌 (thermophile), 好冷菌 (psychrophile), 好圧菌 (piezophile), 好酸性菌 (acidophile), 好塩基性菌 (alkaliphile), 好塩菌 (halophile) が挙げられる。生物進化は任意の多様化 (diversification) と選択 (selection) が繰り返された結果であり、生物進化の方向性はそれらが生息する環境因子に支配されている。つまり進化の結果として、極限環境微生物はそれぞれの過酷な環境を“好んで”生息しており、決してこれらの環境条件に“耐えている”訳で

はない。例えば好熱・好酸性菌の *Picrophilus torridus* の至適生育温度は 60°C，至適 pH は 0.7 であり、pH が -0.06 でも分裂可能であるが、pH が 4 程度を上回ると、酸性度が足りず死滅してしまうほどである。つまり *P. torridus* にとっては、常温・常圧・中性付近の pH は逆に生命を維持できない“極限”環境である。本稿では、極限環境微生物の中でも好熱菌に焦点を当て、それらの生理特性をはじめ、生体分子の構造や代謝の特徴を紹介し、超好熱菌の高温領域における生命維持戦略を考えたい。

2. 超好熱菌

古くから我々の体や生活様式との関連が深い、酵母、大腸菌、枯草菌などの微生物は至適生育温度が 20-50°C の間にあり、常温菌 (mesophile) と呼ばれている。常温菌であっても生育温度の上限が 50°C を越える場合もある。好熱菌 (thermophiles) は一般にこれらよりも高い温度域で生育可能な微生物の総称である。好熱菌には様々な定義があるが、至適生育温度が 50-64°C の好熱菌を特に中等度好熱菌 (moderate thermophile) と言い、*Bacillus stearothermophilus* などがよく知られている。至適生育温度が 65-79°C のものは高度好熱菌 (extreme thermophile) と呼ばれ、*Thermus*

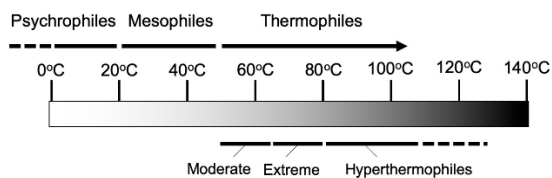


Fig.1 Classification of organisms that grow at different temperatures.

thermophilus はこれらの中のモデル生物として盛んに研究されている。さらに、至適生育温度が 80°C 以上のものは超好熱菌 (hyperthermophile) と呼ばれている (Fig.1)。

好熱菌は温泉地帯、海底の熱水噴出孔、高温コンポストなど、水を含む様々な高温環境から分離・同定されている。海底から噴出する熱水の温度は 300°C 以上になることもあり、周囲の 5-10°C の海水と混じって、噴出孔付近には幅広い温度勾配が形成されている。このような高温環境から至適生育温度が 100°C を越える超好熱菌が数多く分離されている。また海底は高圧環境でもあり、例えば水深 4000 m 以上の海水から分離された *Pyrococcus yayanosii* は、生育温度範囲 80-108°C (至適 98°C)、生育圧力範囲は 20-120 MPa (至適 52 MPa) である。本菌にとって、500 気圧を超える圧力が最も心地よいということになり、やはり進化の方向性は環境によって支配されていることが実感できる。現在、細胞分裂が観察されている最も高い温度は海洋性のメタン生成菌 *Methanopyrus kandleri* (Fig.2) の 122°C である。

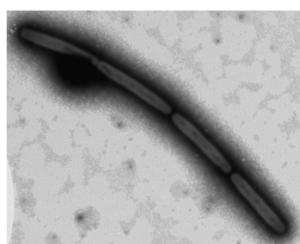


Fig.2 *Methanopyrus kandleri* 116, a hyperthermophilic archaeon that can grow at 122°C under 40 MPa pressure. The electron micrograph was kindly provided by Dr. Ken Takai from JAMSTEC.

3. 生物の進化系統樹とアーキア

生命を分類する基準や手法は多数あるが、現在では分子系統学的解析が大きな指標となっている。分子系統学的解析では、個々の生物に共通に存在する遺伝子 (群) やタンパク質 (群) の配列情報を比較することにより、生物間の近縁性 (遠縁性) を計算し、系統樹として表す (Fig.3)。1977 年に米国イリノイ大学の Carl Woese 博士らが 16S ribosomal RNA 配列を比較し、多様な生物を対象とした系統樹を作成した。¹⁾ その結果、生物は大きく 3 つの枝 (=生物ドメイン) に分かれ、それぞれのドメインを Eucarya (真核生物)、Bacteria (細菌)、Archaeobacteria (古細菌) と名付けた。Archaeobacteria はその後、Bacteria (細菌) と区別するために、Archaea (アーキア) と呼ばれるようになった。

アーキアの細胞は細菌と同じ程度の大きさで、細菌と同様、核をもたない原核生物である。しかしながらアーキアは、細菌や真核生物には見られない数多くの生理的特徴を有する。その細胞膜の構造を例に取ると、細菌や真核生物では細胞膜脂質分子は直鎖状の脂肪酸が 2 つ、エステル結合を介してグリセロールと *sn*-1,2 の位置で結合するのに対し、アーキアでは脂肪酸の代わりに主に C20 のイソプレノイド鎖がエーテル結合を介して *sn*-2,3 の位置で結合してい

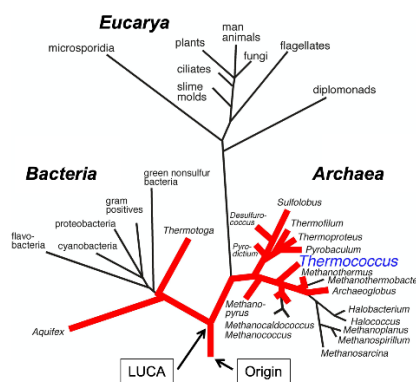


Fig.3 A phylogenetic tree was life based on 16S rRNA sequences. The red (bold) lines indicate branches occupied by hyperthermophiles. Origin, Origin of life; LUCA, Last Universal Common Ancestor.

る (Fig.4)。さらにアーキアの特異性は DNA 複製機構、転写機構、代謝様式にもおよぶ。DNA 複製に参与するタンパク質因子の大半は真核生物が利用する因子と類似している。また転写に関しても、アーキアは細菌の多くが利用する σ 因子、 $\alpha_2\beta\beta'\omega$ 型の RNA polymerase を利用するのではなく、TATA box, TATA-binding protein, transcription factor B などが関与する真核生物型の RNA polymerase を用いる。²⁾ 代謝様式で最も特徴的な点はアーキアのメタン生成能である。これは真核生物や細菌には見られない、アーキア独自のエネルギー獲得機構である。

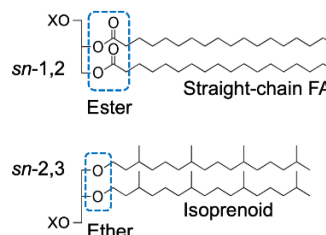


Fig.4 Structures of membrane lipids from bacteria and eukaryotes (upper) and archaea (lower).

Fig.3 で示した系統樹は、各構成員の進化過程をも表すと考えられている。系統樹中の赤線は超好熱菌を示しているが、これらは例外なく生命の起源や生命の最終共通祖先 (LUCA) に最も近い位置を占めている。したがって超好熱菌は現存する生物の中で、最も原始生命体の姿に近いものとして考えられ、生命の誕生やその進化の観点から注目を集めている。系統樹における 3 つのドメインの分岐点を見ると、まず細菌がアーキア・真核生物から分岐し、その後アーキアと真核生物が分岐している。つまりアーキアと真核生物は共通の祖先から進化してきたことが伺える。アーキアの DNA 複製・転写機構が真核生物型と前述したが、進化的に考えればむしろ、真核生物の機構はアーキア型あるいはアーキアと共通であると考えた方が正しい。

4. 超好熱菌の多様性

過酷な温度域に生息する超好熱菌ではあるが、その種類や代謝様式は極めて多様である。ドメイン別に見ると、Eucarya では、生育温度の上限が 60-65°C に達するものが同定されているものの、超好熱性の真核細胞はまだ確認されていない。Bacteria に属する好熱菌は数多く同定されており、前述の *Thermus* 属細菌や、その高いセルロース分解能が注目を集めている *Caldicellulosiruptor* 属細菌をはじめ、

Geobacillus 属, *Thermoanaerobacter* 属, *Thermaerobacter* 属, *Rhodothermus* 属などが挙げられる。しかしこれらは全て高度好熱菌に分類され、超好熱性の細菌となると、その種類は比較的限定される。超好熱性細菌の代表例は *Aquifex* 属細菌と *Thermotoga* 属細菌で、いずれも至適生育温度は 80-85 °C 程度であり、生育温度上限は 90-95 °C である。一方、Archaea に属する超好熱菌は数多く存在し、至適生育温度、生育温度上限ともに細菌のものよりもはるかに高い。代表的な超好熱性アーキアの特徴については後述する。

超好熱菌の代謝様式についても多くの知見が蓄積されており、非常に多様であることがわかってきている。一般的に代謝は異化代謝 (catabolism) と同化代謝 (anabolism) に大別できるが、前者は主として細胞の生命維持に必要なエネルギーを獲得するための代謝であり、後者は細胞を構成する生体分子を合成するための代謝である。我々 (ヒト) は体内でグルコースや脂肪を完全燃焼 (酸化) して、その燃焼熱の一部を化学エネルギー (ATP, adenosine 5'-triphosphate) として保存している。これらの反応は簡単に $\text{organic carbon} + \text{O}_2 + \text{ADP} + \text{Pi} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{ATP}$ (ADP, adenosine 5'-diphosphate; Pi, phosphate) と表すことができる。またヒトは同化代謝においても有機物を出発原料としており、典型的な従属栄養性の代謝様式である。異化代謝の主目的はエネルギー獲得であるので、当然ながら有機反応である必要は全くない。植物や藻類、藍藻などの光独立栄養生物は光のエネルギーを利用する。化学独立栄養生物は様々な無機反応を利用して化学エネルギーを保存する。これらの独立栄養生物の同化代謝の炭素源は二酸化炭素であり、これを還元しながら生命維持に必要な全生体分子を合成している。超好熱菌には従属栄養性のものもあれば化学独立栄養性のものもある。

化学独立栄養性超好熱菌の代表例は超好熱性のメタン生成菌である。前述の通りメタン生成菌は全てアーキアに属し、常温性 (*Methanosarcina barkeri*, 至適生育温度 37 °C)、高度好熱性 (*Methanothermobacter thermautotrophicus*, 至適生育温度 65 °C)、超好熱性 (*Methanocaldococcus jannaschii*, 至適生育温度 85 °C, *Methanopyrus kandleri*, 至適生育温度 105 °C) のものが知られている。これらは二酸化炭素と水素からメタンと水を生成する発エルゴン反応を利用して、細胞増殖に必要なエネルギーを得ている。また細胞を構成する有機物の炭素も全て二酸化炭素から供給できる代謝系を備えている。化学独立栄養性の超好熱菌としては、その他、硫酸還元菌、水素酸化菌、硫酸酸化菌などがあり、常温菌に匹敵する多様な代謝様式を示す (Table 1)。一方、光エネルギーを利用する超好熱菌は現在知られていない。多くの超好熱菌は深海や温泉の地下源泉に生息しており、太陽光が届かない環境では光を利用する選択圧がなかったからそのような代謝様式は発達してこなかった可能性がある。

従属栄養性の超好熱菌も数多く分離され、糖類、アミノ酸・ペプチド類、有機酸などを炭素源に、またそれらの酸化反応をエネルギー源に利用している。好気性微生物は有機物の酸化反応の際に得られる電子を酸素分子に与え、水を生成する。*Sulfolobus acidocaldarius* や *Aeropyrum pernix* など、超好熱菌の中にも酸素を最終電子受容体に用いるものもあるが、*Thermococcus kodakarensis* や *Archaeoglobus fulgidus* など、元素硫黄や硫酸に電子を与え、硫化水素を発生するものも多い (Table 1)。*Geoglobus ahangari* など、 Fe^{3+} に電子を与える超好熱菌も同定されている。またプロトンや代謝産物に電子を与え、水素やアルコール発酵を利用するものも少なくない。超好熱菌の多くは分子状酸素を利用せず、嫌気性であるが、これは生命が誕生した初期の地球環境における酸素分圧が今より低かったためか、あるいは常温の水と比べ、熱水における分子状酸素の溶解度が低い

Table 1 Selected hyperthermophile species and their properties for growth.

Species (Bacteria/Archaea)	Optimal growth temperature	Genome size (GC%)
Representative energy-conserving reaction		
<i>Aquifex aeolicus</i> (Bacteria)	85 °C	1.55 Mbp (43.4 %)
$\text{H}_2 + 0.5\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$		
<i>Thermotoga maritima</i> (Bacteria)	85 °C	1.86 Mbp (46 %)
Organic 2[H] + S ⁰ → H ₂ S		
<i>Aeropyrum pernix</i> (Archaea)	90-95 °C	1.67 Mbp (56.3 %)
Organic 2[H] + 0.5O ₂ → H ₂ O		
<i>Archaeoglobus fulgidus</i> (Archaea)	83 °C	2.18 Mbp (48.5 %)
Organic 8[H] + SO ₄ ²⁻ + 2H ⁺ → H ₂ S + 4H ₂ O		
<i>Geoglobus ahangari</i> (Archaea)	88 °C	1.77 Mbp (53.1 %)
$\text{H}_2 + 2\text{Fe}^{3+} \rightarrow 2\text{Fe}^{2+} + 2\text{H}^+$		
<i>Ignicoccus hospitalis</i> (Archaea)	90 °C	1.30 Mbp (56.5 %)
$\text{H}_2 + \text{S}^0 \rightarrow \text{H}_2\text{S}$		
<i>Methanopyrus kandleri</i> (Archaea)	98 °C	1.69 Mbp (62.1 %)
$4\text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$		
<i>Pyrococcus furiosus</i> (Archaea)	95-100 °C	1.91 Mbp (40.8 %)
Organic 2[H] + S ⁰ → H ₂ S		
<i>Pyrolobus fumarii</i> (Archaea)	106 °C	1.84 Mbp (54.9 %)
$\text{H}_2 + 0.5\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$		
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i> (Archaea)	75-80 °C	2.23 Mbp (36.7 %)
Organic 2[H] or H ₂ + 0.5O ₂ → H ₂ O		
<i>Thermococcus kodakarensis</i> (Archaea)	85 °C	2.09 Mbp (52.0 %)
Organic 2[H] + S ⁰ → H ₂ S		

からか、様々な説が提唱されている。

5. 超好熱菌生体分子の特徴

好塩菌、好酸性菌、好アルカリ性菌などは極端な塩濃度やプロトン濃度に適応した極限環境微生物であるが、塩やプロトンの濃度は化学的パラメーターであるため、仮に塩やプロトンの細胞内への侵入を完全に防ぐことができれば、細胞内で機能する生体分子は従来生物と同様な性質のものでも問題ない。一方、好熱菌、好冷菌、好圧菌は温度や圧力など物理的パラメーターの極端な領域に適応したものである。熱や圧力の細胞内への進入はタンパク質や脂質、糖質で構成された細胞表層ではとても防ぐことはできない。したがって高温環境で生息する好熱菌・超好熱菌においては、細胞内の全ての分子が高温領域で構造を維持し、正しく機能する必要がある。細胞を構成する主要な機能分子としては、核酸 (DNA・RNA)、タンパク質、膜脂質、多糖類を挙げることができる。

5.1 核酸

細胞内の全タンパク質のアミノ酸配列は染色体 DNA (デオキシリボ核酸) の塩基配列にしたがって規定されている。DNA の構造維持は生命にとって不可欠であるが、DNA の二重らせん構造は温度の上昇とともに徐々に解かれ、90-

100 °Cの温度域では2本の鎖は完全に互いから解離してしまう。これをDNAの熱変性とよぶ。GC間の水素結合がAT間の水素結合よりも多いため、一般にGとCの割合(GC content, GC%)が高いDNAの方が、変性温度が高い。

超好熱菌の中には100 °C以上の高温でも生育するものもあり、それらが保有する染色体DNAがどのように二重らせん構造を維持しているのかは、超好熱菌が発見された当初から関心を集めていた。好熱菌の染色体DNAは極端に高いGC%を示すことも予想されたが、結果的にTable 1に示すとおり、生育温度範囲と染色体DNAのGC%との間には相関はない。例えば100 °C付近で生育する*Pyrococcus furiosus*のGC% (40.8%)は、至適生育温度37 °Cの大腸菌のGC% (50.8%)よりも低い。

常温菌も含めて、生物の染色体DNAは一般にヒストンなどのタンパク質と相互作用してコンパクトに折り畳まれている。種によって利用しているタンパク質が異なるものの、超好熱菌にもヒストン様タンパク質などDNA結合タンパク質が存在する。これらのタンパク質は極めて高い熱安定性を示し、DNAの折り畳みや二重らせん構造の安定化に寄与していることが示唆されている。^{3,4)} しながら、これらの効果だけでは100 °Cを越える温度でも生育する超好熱菌におけるDNAの構造維持は説明できない。

高温環境におけるDNAの構造維持に関して、最も注目されている因子は、reverse gyraseという酵素である。⁵⁾ Reverse gyrase遺伝子は、細菌・アーキアを問わず、全ての超好熱菌ゲノム上に例外なく存在し、常温菌ゲノムには一切存在しない唯一の遺伝子である。Reverse gyraseはATP依存的なDNA topoisomeraseの一種であり、単位長さ当たりのDNAの巻き数を増やす機能、つまり環状染色体のpositive supercoilを生み出すはたらきを示す。常温細菌は一般にDNA gyraseをもっており、逆に環状染色体DNAの巻き数を減らすことによりnegative supercoil構造をもたらす。複製や転写においてDNAの二重らせん構造が常温でも局所的にほどきやすい状態にしていると考えられている。逆にreverse gyraseによるDNAのpositive supercoilingは二重らせん構造をきつく締めることにより、高温環境における染色体DNAの安定化に寄与すると考えられる。

超好熱菌細胞内のreverse gyraseの効果を直接検証するために、筆者らのグループは超好熱菌でアーキアに属する*Thermococcus kodakarensis*を対象に遺伝学的な解析を進めた。⁶⁾ *T. kodakarensis*は実験室内の培養条件では85 °Cの至適生育温度を示し、染色体上にreverse gyrase遺伝子を1つもつ。そこで本菌のreverse gyrase遺伝子を破壊した株(Δ rgy株)を作製し、様々な温度で培養実験を行った。その結果、 Δ rgy株は60 °Cなど比較的低い温度ではreverse gyrase遺伝子をもつ株(宿主株)とそれほど変わらない増殖速度を示した。しかしながら温度の上昇とともに Δ rgy株の増殖速度は宿主株と比べて小さくなり、93 °Cではその生育は観察されなかった(Table 2)。このことからreverse gyraseは高温環境における生命維持や増殖にとって重要な役割を果たすことが示され、DNAのpositive supercoilingは高温における染色体DNAの安定性に寄与することが示唆された。

核酸の熱安定性にはタンパク質との結合やreverse gyraseなどによる巻き数の増加以外に、低分子化合物の作用も寄与する。代表的な分子としてポリアミンが挙げられる。ポリアミンは、スペルミジン [34]、スペルミン [343] (Fig. 5, b, c) など、一般にアミノ基が3つ以上結合した直鎖脂肪族炭化水素をいう。プトレシン (Fig. 5, a) などのジアミンを含める場合もある。プトレシン、スペルミジンやスペルミンは大腸菌からヒトまで、あらゆる生物に存在するポリアミンで、細胞分裂、分化、ストレス応答などに関与する。ポリアミンはウイルス内にもその存在が確認されている。

Table 2 Specific growth rates of the *T. kodakarensis* host strain and the Δ rgy strain at various temperatures.

Temperature	Specific growth rate (h ⁻¹)	
	Host strain	Δ rgy strain
60 °C	0.24	0.19
65 °C	0.28	0.22
70 °C	0.39	0.30
70 °C	0.50	0.40
80 °C	0.60	0.38
80 °C	0.69	0.34
90 °C	0.39	0.18
93 °C	0.33	No growth

一方、好熱菌や超好熱菌にはホモカルドペンタミン [3334] (Fig. 5, d)、カルドヘキサミン [33333] など、さらに長鎖のポリアミン (long-linear-chain polyamines, LCPAs) が存在する。⁷⁾ またN⁴-アミノプロピルスペルミジン [3(3)4] (Fig. 5, e) やN⁴-ビスアミノプロピルスペルミジン [3(3)(3)4] (Fig. 5, g) などの分岐鎖ポリアミン (branched-chain polyamine, BCPAs) の存在も確認されている。LCPAやBCPAは高温域におけるDNAやRNAの構造維持に寄与することが報告されている。2本鎖DNA (dsDNA) に対しては、ポリアミンの鎖長や分岐の有無にかかわらず、添加による変性温度の上昇が観察された。⁸⁾ 一方、stem-loop構造を形成する1本鎖DNA (ssDNA) に対しては分岐鎖ポリアミンが直鎖ポリアミンよりも大きな安定化効果が観察された。さらに、多くの2次構造を形成するtRNAに対するポリアミンの安定化効果が検討された。この場合においても分岐鎖ポリアミンが直鎖のものよりも大きな安定化効果を示し、変性温度の上昇が15 °C程度に達する場合もあった。

超好熱性アーキア*T. kodakarensis*においては、分岐鎖ポリアミンとしてN⁴-アミノプロピルスペルミン [3(3)43] (Fig. 5, f) とN⁴-ビスアミノプロピルスペルミジン [3(3)(3)4] (Fig. 5, g) の存在が確認されている。⁹⁾ またこれらの合成に関わる新規branched-chain polyamine synthase A (BpsA) が同定され、アルギニンを出発化合物とした生合成経路の全容も解明されている。BpsAの遺伝子TK1691を破壊した*T. kodakarensis*変異体(Δ bpsA株)は、*T. kodakarensis*の至適生育温度である85 °Cにおいては対数増殖期の開始に至るまでのlag期の若干の延長が観察されたものの、比増殖速度や最終細胞収量は宿主細胞と大きな差はなかった。一方、93 °Cでは宿主細胞は増殖を示したものの、分岐鎖ポリアミンを合成できない Δ bpsA株の増殖は観察されなかった。

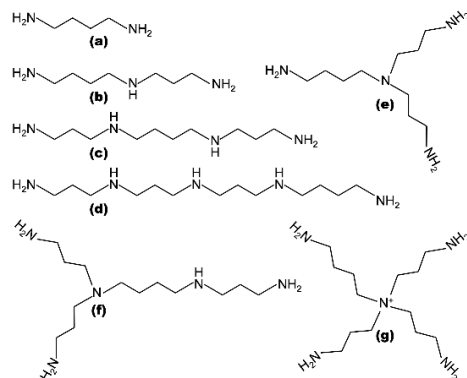


Fig. 5 Structures of various polyamines. Putrescine (a), spermidine (b), spermine [343] (c), homocaldopentamine [3334] (d), N⁴-aminopropylspermidine [3(3)4] (e), N⁴-aminopropylspermine [3(3)43] (f), N⁴-bis(aminopropyl)spermidine [3(3)(3)4] (g). Compounds a-c are found in all forms of life, whereas compounds e-g are distributed in thermophilic organisms.

そこで N^4 -ビスアミノプロピルスペルミジン[3(3)(3)4]を培地に添加したところ、93°Cにおける Δ bpsA株の増殖を部分的に回復することが明らかとなった。⁹⁾ これらの結果から、93°Cにおける *T. kodakarensis* の増殖には分岐鎖ポリアミンが重要な役割を果たすことが示された。

最近、分岐鎖ポリアミンが高温域における DNA の安定性のみならず、転写や翻訳に関わる RNA ポリメラーゼやリボソームの安定性にも寄与することが示唆された。¹⁰⁾ RNA ポリメラーゼやリボソームはそれぞれ多くのタンパク質が会合した複合体として機能する。*T. kodakarensis* の宿主株から精製した RNA ポリメラーゼは Δ bpsA株から精製した酵素よりも多くのサブユニットを保持しており、分岐鎖ポリアミンが RNA ポリメラーゼ複合体の構造維持に寄与することが示唆された。トランスクリプトーム解析も行われ、 Δ bpsA株では数多くの遺伝子の発現量が宿主株と比較して変動していた。これらの結果から、分岐鎖ポリアミンは高温環境において DNA, RNA, タンパク質の構造維持に重要な役割を果たし、多様な生理機能に関与していることが示唆されている。

5.2 タンパク質

タンパク質は物質の輸送、情報伝達、代謝、DNA 複製、遺伝子発現など細胞のあらゆる生命活動の中で中心的な役割を果たし、細胞の形態維持にも関与する。一部の例外を除き、酵素は全てタンパク質であり、酵素を利用することにより、種々の合成反応を穏和な条件下で、有機溶媒を使用することなく行うことができる点は、古くから酵素利用の長所として捉えられてきた。しかしながら、これを逆説的に捉えると、酵素は穏和な条件下でしか利用できない、という短所と言うこともできる。

前述のとおり、生命を維持するために好熱菌由来の生体分子は全て高温域で効率よく機能する必要があり、酵素も例外ではない。したがって好熱菌・超好熱菌は耐熱性を示す、安定な生体触媒の供給源としても注目を集めている。好熱菌由来の酵素として最も利用されているものは PCR (Polymerase Chain Reaction) 法に用いる耐熱性 DNA ポリメラーゼである。PCR 法は遺伝子の増幅の有無により、試料における特定微生物・ウイルスの有無を比較的容易に判定できる。また増幅 DNA の塩基配列を決定することにより、品種の判定、変異体の判定も可能となり、その他親子判定、犯罪捜査にも利用される技術である。常温菌由来の DNA ポリメラーゼを用いても原理的には PCR を行うことは可能であるが、DNA の熱変性段階中に DNA ポリメラーゼも熱変性のため活性を失うので、その後、酵素を新たに加える必要がある。超好熱菌由来の耐熱性 DNA ポリメラーゼを利用することで、酵素の再添加が不要となり、PCR の全自動化が可能となった。耐熱性 DNA ポリメラーゼとして、高度好熱性細菌 *Thermus aquaticus* (Taq DNA polymerase)、超好熱性アーキア *Pyrococcus furiosus* (Pfu DNA polymerase)、*T. kodakarensis* (KOD DNA polymerase) 由来のものなどが市販されている。

好熱菌由来タンパク質が高温域においても活性や構造を維持できる要因は好熱菌発見当初から注目されていた。好熱菌は常温生物と異なるアミノ酸を利用しているという説、あるいは好熱菌由来酵素は実は寿命が短く、細胞内で新しい酵素が常に再供給されているという説など、様々な議論があったようである。その後、分離された好熱菌の種類が増え、アミノ酸配列と立体構造が明らかとなった酵素も増加し、常温菌・好熱菌・超好熱菌から、同一の活性や機能を示す酵素の立体構造を比較することが可能となった。まず明らかとなったのは、例外はあるものの、同一機能を示すタンパク質であれば、好熱菌由来のタンパク質の全体構

造は常温菌由来のものと同様しているものが多いことである。そのような類似した構造の中で、アミノ酸部位特異的変異導入と熱安定性評価などの解析により、異なる熱安定性を示す構造的要因が明らかとなった。ここでは、それらの一部を *T. kodakarensis* 由来 O^6 -methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) を例に紹介する。

MGMT はアルキル化されたグアニンのメチル基を除去する DNA 修復酵素の一種である。¹¹⁾ MGMT は単量体として機能する比較的小さなタンパク質である。超好熱性アーキア *T. kodakarensis* 由来 MGMT (Tk-MGMT) は 174 個のアミノ酸残基で構成され、90°Cで 30 分間加熱しても安定に構造を維持する高度の熱安定性を示す。一方、大腸菌の Ada タンパク質 (adaptive response regulatory protein) の C 末端側 19 kDa の domain (Ec-AdaC) も methyltransferase 活性を有し、Tk-MGMT と Ec-AdaC のタンパク質全体の構造は極めて類似している。双方の立体構造に基づいて、構造的特徴の比較が行われた (Table 3)。結晶構造中の残基数はほぼ等しく、アミノ酸組成も大きく異なるものではなかった。違いが見られたのは、電荷を帯びたアミノ酸残基の数であり、Tk-MGMT (48 個) の方が Ec-AdaC (37 個) よりも 30%程度多く含まれていた。溶媒と接するタンパク質の分子表面に注目すると様々な違いが浮かび上がる。まずタンパク質分子表面の総面積 (溶媒露出表面積, solvent accessible surface area) を比較すると Tk-MGMT の方が小さいことがわかる。これは耐熱性を示す Tk-MGMT タンパク質の方が密にパッキングされていることを意味する。また Tk-MGMT 分子表面に存在する疎水性残基 (24%) や極性残基 (22%) の割合は Ec-AdaC よりも明らかに低く、代わりに電荷を帯びた残基の割合 (54%) が高く、分子表面が極めて親水性であることがわかる。Tk-MGMT に限らず、超好熱菌由来酵素では、分子表面に電荷を帯びた残基間のイオン結合形成が多くの場合で認められ、これらがタンパク質の耐熱化に寄与すると考えられている。また超好熱菌由来タンパク質は、高濃度に濃縮しても沈殿しない特徴を示すことが多いが、これもそれらの分子表面が高度に親水性であることに由来すると考えられている。一方、分子内部の構造にも興味深い差が認められる。一般にタンパク質の内部やコアには疎水性のアミノ酸残基が多く含まれ、タンパク質の折り畳み構造の維持に寄与する。疎水コアを比較すると、Tk-MGMT にはフェニルアラニンなど、多くの芳香族アミノ酸が存在し、Ec-AdaC よりもタンパク質内部の疎水性相互作用が強固になっている。またタンパク質内の α -helix 構造にも興味深い違いが見られた。 α -helix 構造は一般にタンパク質の主鎖上のカルボニル基・アミノ基間の水素結合により形成され、側鎖間の相互作用は限定的である。しかしながら Tk-MGMT の場合では、 α -helix を構成する残基の側鎖間にもイオン結合を介した相互作用が観察され、 α -helix 構造が大幅に補強されている。さらに、異なる α -helix の間にもより多くのイオン結合性相互作用の存在が示唆されており、これら分子内部のイオン結合の違いも Tk-MGMT と Ec-AdaC の熱安定性の差に寄与していると考えられる。

このような構造比較は、多数のタンパク質について行われ、寄与の大小はあるものの、耐熱性を示すタンパク質の特徴は次のようにまとめることができる。(i) 折り畳まれたタンパク質のコア部分の疎水性が高い、(ii) タンパク質表面の面積が小さく、親水性が高い、(iii) 複数のアミノ酸残基が関与するイオンペアネットワークが存在する、(iv) 機能に関与しないループ構造が短い。なお、タンパク質の熱力学的な安定性 (折り畳まれた構造と変性状態のタンパク質との間の自由エネルギー差) への寄与は、(i) が最も大きい。

Table 3 A comparison of the solvent accessible surface areas (SASA) of Tk-MGMT and AdaC.

	Tk-MGMT	AdaC
Residues in crystal structure	169	165
Hydrophobic residues	75	78
Polar residues	46	50
Charged residues	48	37
Total SASA (Å ²)	8160	8339
Hydrophobic residue SASA	1935	2638
Polar residue SASA	1797	2752
Charged residue SASA	4428	2949

5.3 脂質

上述の通り、膜脂質については真核生物と細菌に見られる構造とアーキアにおける構造との間に大きな違いが存在する (Fig.4)。すなわち、膜脂質の構造は生物ドメインで一義的に決定され、同一ドメイン内の常温菌と好熱菌の間でも構造における大きな相違はない。

Fig.3の進化系統樹からも分かるように、超好熱菌は細菌に属するものとアーキアに属するものが存在するが、種数はアーキアに属するものが圧倒的に多い。また生育温度の上限が高い超好熱菌は全てアーキアに属する。細菌に属する超好熱菌の代表例として *Aquifex* 属や *Thermotoga* 属の細菌が挙げられるが、これらの生育温度の上限は 80-90°Cがほとんどである。これに対して、アーキアに属する超好熱菌については、前述の *Methanopyrus* 属 (122°C) をはじめ、*Geogemma* 属 (121°C)、*Pyrolobus* 属 (113°C)、*Pyrococcus* 属 (103°C) のアーキアなど、105°C以上の環境でも生育するものが多い。これはアーキアが化学的により安定なエーテル型脂質を利用していることに起因するのではないかと考えられている。

アーキアのエーテル型脂質には構造上、さらに大きな特徴がある。つまり C20 のイソプレノイド鎖をもつアーキオール (archaeol, Fig.6A) のみならず、C40 のイソプレノイド鎖が両端でグリセロールと結合しているテトラエーテル型脂質カルドアーキオール (caldarchaeol) をも利用する (Fig.6B)。カルドアーキオールは伸びた状態では、共有結合で結ばれた 1 つの分子で脂質二重膜の厚みをスパンし、膜構造の強化に大きく寄与すると考えられている。

細胞膜は一般にその細胞が生育する温度範囲で適切な流動性を示す液晶相を維持するように制御されている。細菌や真核生物では膜脂質の脂肪酸部位の鎖長、不飽和結合の割合、極性基 (アーキア膜脂質の極性基は Fig.6 中の X) の種類を変化させることによりその制御を達成している。一般的な常温細菌の脂質膜構造は 65°C程度で液相に転移してしまうと考えられているが、アーキア由来膜脂質では 100°C程度まで液晶状態が保持される。¹²⁾ アーキアは温度の上昇に伴って、カルドアーキオールの割合を増加させたり、カルドアーキオールに含まれるシクロペンタン環の数を増加させることが報告されている (Fig.6C)。シクロペンタン環の増加により、膜脂質のパッキングが増加し、流動性が減少すると考えられている。実際、試験管内の評価では細菌由来膜脂質から構成されたリポソームと好熱性アーキア *Sulfolobus acidocaldarius* 由来膜脂質から構成されたリポソームのイオン透過性が比較された。アーキア膜脂質から構成されたリポソームは 100°C、30 分の加熱においてもほとんどイオンを漏らすことはなかったが、細菌由来の膜脂質を用いたリポソームは 100°Cで構造が速やかに崩壊した。¹³⁾

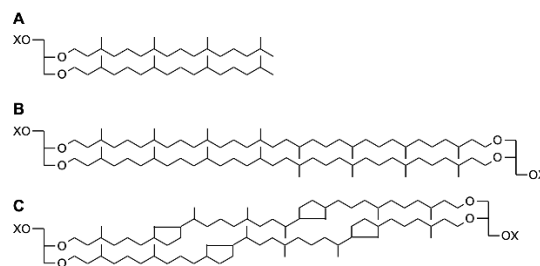


Fig.6 The diversity in structures of membrane lipids in archaea. A, Structure of archaeol; B, Structure of caldarchaeol; C, Structure of caldarchaeol with cyclopentane moieties.

6. 超好熱菌代謝の特徴

上述のとおり、reverse gyrase は好熱菌に特異的に存在する唯一の酵素である。しかしながら、若干の例外はあるものの、reverse gyrase と同様、その存在が著しく好熱性微生物に偏ったタンパク質は他にも存在する。その 1 つは糖新生系の鍵酵素 fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) である。¹⁴⁾ 糖のピルビン酸までの初期分解を担う解糖系の 1 種 Embden-Meyerhof 経路と糖を合成する糖新生系は多くの酵素を共通に利用する。酵素が異なるのは fructose 6-phosphate (F6P) と fructose 1,6-bisphosphate (FBP) との間の変換においてである。解糖方向では、phosphofruktokinase (PFK) は、ATP をリン酸基供与体として F6P を不可逆的にリン酸化し FBP を生成する。一方、糖新生系方向では FBPase が FBP の不可逆的な脱リン酸化反応を触媒し、F6P を生成する (Fig.7)。PFK, FBPase はそれぞれ解糖系、糖新生系の鍵酵素であり、その活性は厳密に制御されていなければならない。2 つの活性が同時に細胞内に存在すると、ATP を消費する PFK の反応で F6P から FBP が生成し、FBPase はその FBP を加水分解して再び F6P に戻してしまうので、ATP だけが消費されていく futile cycle が形成される。

T. kodakarensis が糖を含まない培地においても生育するにもかかわらず、ゲノム上に既存の FBPase 遺伝子が存在しない。そこで筆者らのグループは活性を指標に本菌の FBPase を精製し、同定することができた。¹⁴⁾ このタンパク質 (Tk-FBPase) は既存の酵素とは異なる配列・構造を示す新型の FBPase であった。興味深いことに Tk-FBPase と相同性を示すホモログはアーキア・細菌を問わずほとんどの好熱菌ゲノム上に見つかり、常温生物ゲノム上には存在しない。その後、Fuchs らは、この新型 FBPase は FBPase 反応のみならず、糖新生系におけるその 1 つ前の fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBP aldolase) 反応をも触媒することを発見した。¹⁵⁾ 同一ポリペプチドに活性中心を 2 つもつような bifunctional enzyme は数多く報告されているが、本酵素は 1 つ目の FBP aldolase 反応が完了した後に酵素の構造が変化し、FBPase 反応の活性中心構造が形成され、2 つ目の FBPase 反応が進行する。^{16,17)} 本酵素は FBP aldolase/phosphatase (FBPAP) と命名され、dihydroxyacetone phosphate (DHAP) と glyceraldehyde 3-phosphate (GAP) を 1 つの酵素で、F6P にまで変換する。筆者の知る限り、このような真の bifunctional enzyme は本酵素のみである。アーキア・細菌を問わず、FBPAP が好熱菌に特異的に分布する理由が注目されたが、現在は、熱安定性が極めて低い FBP が酵素から遊離して FBPase に出会うまでの間に熱に晒されることを回避していると考えられている。解糖系の下流においても同じような例が挙げられる。解糖系では GAP は GAP dehydrogenase により、リン酸化を伴って酸化され、1,3-bisphosphoglycerate (1,3-BPG) が生成する。続いて ATP の生成を伴って 3-phosphoglycerate kinase (PGK) により

3-phosphoglycerate (3-PGA) にまで変換される。一方、多くの超好熱菌では GAP は non-phosphorylating GAP dehydrogenase (GAPN) や GAP:ferredoxin oxidoreductase (GAPOR) により、熱に弱い 1,3-BPG を介することなく 3-PGA にまで直接酸化される。¹⁸⁾ このように超好熱菌は熱分解の激しい代謝中間体が遊離・蓄積することのないよう、代謝経路がうまく設計されている。

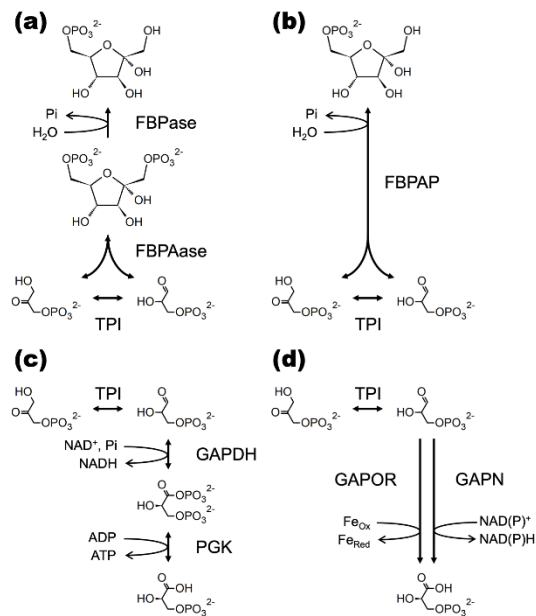


Fig.7 Differences in key steps of central carbon metabolism in classical organisms and hyperthermophiles. The conversion from DHAP and GAP to F6P in *Escherichia coli* (a) and *T. kodakarensis* (b). The conversion from GAP to 3-PGA in *E. coli* (c) and *T. kodakarensis* (d).

7. おわりに

いままで述べてきたとおり、地球上の熱水環境にはそれぞれの環境に見事に適応した好熱菌が息している。独立栄養生育・従属栄養生育を示すもの以外にも、今回は紹介できなかったが、他の微生物に依存して生育する寄生性の超好熱菌もあり、高温環境の生態系は常温の世界に負けないくらいの多様性を示す。さらには超好熱性のウイルスも数多く確認されている。好熱菌に限らず、我々の微生物に対する認識は現在も拡大し続けている。塩基配列決定技術の進歩により、微生物を培養しなくても、環境試料から直接 DNA 解析 (メタゲノム解析) が可能となった。その結果、我々がいままでに培養・分離・観察してきた微生物は、環境中に存在する微生物の 0.1-1 % 程度にすぎないと予想されている。したがって、我々の微生物あるいは生命に対する理解は、ほんの一握りのモデル生物を対象として進められてきた研究成果に基づいていることになる。今後の研究の進展は、従来の生化学、分子生物学、遺伝学などとともに、バイオインフォマティクスを駆使して、如何に膨大な遺伝子配列の情報を有効活用できるかが大きな鍵を握る。また環境中の微生物の多くは難培養微生物であり、未だに培養条件が確立されていないものが大半である。そのような観点から、培養における技術革新も非常に重要な研究課題であると考えられる。微生物学は今後、生命の共通性よりはむしろ生命の多様性を強く意識して進められ、我々の限定的な理解や認識を再構築していく必要がある。

謝 辞

超好熱菌に関する研究の一部は、今中忠行先生、藤原伸介先生、福居俊昭先生、金井保先生、佐藤喬章先生と共に行ったものであり、ここに感謝の意を表します。

文 献

- 1) C. Woese and G. Fox, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5088-5090 (1977).
- 2) A. Hirata, B. Klein, and K. Murakami, *Nature* **451**, 851-854 (2008).
- 3) W. Li, R. Grayling, K. Sandman, S. Edmondson, J. Shriver, and J. Reeve, *Biochemistry*, **37**, 10563-10572 (1998).
- 4) H. Higashibata, S. Fujiwara, M. Takagi, and T. Imanaka, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **258**, 416-424 (1999).
- 5) P. Forterre, *Cell* **85**, 789-792 (1996).
- 6) H. Atomi, R. Matsumi, and T. Imanaka, *J. Bacteriol.*, **186**, 4829-4833 (2004).
- 7) A. Michael, *J. Biol. Chem.* **293**, 18693-18701 (2018).
- 8) Y. Terui, M. Ohnuma, K. Hiraga, E. Kawashima, and T. Oshima, *Biochem. J.* **388**, 427-433 (2005).
- 9) K. Okada, R. Hidese, W. Fukuda, M. Niitsu, K. Takao, Y. Horai, N. Umezawa, T. Higuchi, T. Oshima, Y. Yoshikawa, T. Imanaka, and S. Fujiwara, *J. Bacteriol.* **196**, 1866-1876 (2014).
- 10) Y. Yamori, M. Hamakawa, R. Hidese R, M. Fukuda, H. Atomi, W. Fukuda, and S. Fujiwara, *Amino Acids* **52**, 275-285 (2020).
- 11) H. Hashimoto, T. Inoue, M. Nishioka, S. Fujiwara, M. Takagi, T. Imanaka, and Y. Kai, *J. Mol. Biol.* **292**, 707-716 (1999).
- 12) S. Jain, A. Caforio, and A. Driessen, *Front. Microbiol.* **5**, 641 (2014).
- 13) E. Chang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202**, 673-679 (1994).
- 14) N. Rashid, H. Imanaka, T. Kanai, T. Fukui, H. Atomi, and T. Imanaka, *J. Biol. Chem.* **277**, 30649-30655 (2002).
- 15) R. Say and G. Fuchs, *Nature* **464**, 1077-1081 (2010).
- 16) J. Du, R. Say, W. Lü, G. Fuchs, and O. Einsle, *Nature* **478**, 534-537 (2011).
- 17) S. Fushinobu, H. Nishimasu, D. Hattori, H. Song, and T. Wakagi, *Nature* **478**, 538-541 (2011).
- 18) K. Matsubara, Y. Yokooji, H. Atomi, and T. Imanaka, *Mol. Microbiol.* **81**, 1300-1312 (2011).



跡見 晴幸
Haruyuki Atomi
E-mail: atomi@sbcchem.kyoto-u.ac.jp