

## 2019年度 第2回 創発セミナー 報告

京都大学大学院工学研究科  
跡見晴幸

大隅基礎科学創成財団の第3期 第2回創発セミナーは、田町の東京工業大学キャンパスイノベーションセンターにて、企業の方々と財団関係の研究者とが“スクール形式”でしたが、できるだけ入り交じって話しやすい雰囲気で行われました。テーマは「極限環境生物の驚異の特殊能力 — 人類は何を学べるか」でした。

生命は多様化と選択を繰り返しながら進化し、その方向は環境によって支配されています。古くから研究対象とされてきた微生物の大半は“温和”な環境に生息するものであったため、そこから大きく逸脱した環境には生命は存続し得ないと考えられてきました。しかしながら今では火山地帯・極地・深海・塩湖など、それまでは生命が生息し得ないと考えられてきた環境においても、多様な微生物が存在することが明らかとなりました。これらは、極限環境微生物と呼ばれ、従来から研究されてきた微生物には見られない特殊な生命機能を有することがわかりつつあります。

今回のセミナーでは、高アルカリ性・高温環境に生息する微生物の特殊能力について、以下の2人の方に話をして頂きました。

### 講演 1. 好アルカリ性細菌研究から派生した創薬研究と環境浄化研究への取り組み

東洋大学 生命科学部生命科学科 教授 伊藤政博 氏

伊藤氏は極限環境微生物の中でも好アルカリ性細菌を対象に、その生命維持機構、環境適応機構について精力的に研究を展開しています。今回のセミナーでは好アルカリ性細菌の基本特性、好アルカリ性細菌研究から派生した創薬研究への取り組み、好アルカリ性細菌研究から派生した環境浄化研究への取り組みについて、それぞれ紹介頂きました。



好アルカリ性細菌とは pH10 付近の高アルカリ性環境下で良好な生育を示し、生育に  $\text{Na}^+$  を要求します。このような環境下では細胞外の  $\text{OH}^-$  濃度が高いため、細胞膜の内側と外側の  $\text{H}^+$  濃度勾配を介した  $\text{H}^+$  駆動力を利用しづらいことは容易に想像できます。そのため、好アルカリ性細菌は  $\text{H}^+-\text{Na}^+$  交換輸送体（アンチポーター）を利用して  $\text{H}^+$  濃度勾配を  $\text{Na}^+$  濃度勾配に置き換え、例えば鞭毛モーターは  $\text{Na}^+$  濃度勾配を利用しています。

好アルカリ性細菌の  $\text{H}^+-\text{Na}^+$  アンチポーターは Mrp (Multiple resistance and pH adaptation) と呼ばれ、その機能は高アルカリ性環境下において必須です。Mrp は 7 つの subunit (MrpABCDEF) からなる  $\text{H}^+-\text{Na}^+$  アンチポーターであり、monovalent cation:proton antiporter-3 family の一員です。Mrp は原核生物界に広く分布し、subunit 同士の融合やオペロン内の遺伝子配置などの違いにより、3 つのグループに分類されます。重要なことに黄色ブドウ球菌や緑膿菌の Mrp 型アンチポーターはそれらの病原性と深く関わることが示唆されており、実際それぞれの微生物の Mrp 欠損株を用いたマウス感染モデル実験では顕著な感染毒性の低下が観察されました。

このことから、Mrp の構造機能相関を明らかにし、その感染に果たす役割を理解すれば、新しい感染予防や治療法の開発につながる可能性があります。

Mrp アンチポーターの作動原理はまだ不明ですが、3つの説が提唱されています。1つは MrpA が Na<sup>+</sup>の排出、MrpD が H<sup>+</sup>の取り込みを担うモデルです。2つ目では MrpA と MrpD が H<sup>+</sup>の取り込みを、Na<sup>+</sup>は MrpA と MrpD の境界面で排出され、3つ目のモデルでは MrpA と MrpD が H<sup>+</sup>の取り込みを、Na<sup>+</sup>の排出は MrpBCEFG が担うと考えられています。そこで Na<sup>+</sup>アンチポーター活性を示す *Bacillus* 由来 Mrp 複合体 (Bp-Mrp) と Ca<sup>2+</sup>アンチポーター活性を示す *Thermomicrobium* 由来 Mrp 複合体 (Tr-Mrp) との間で subunit swapping を行い、得られた置換複合体のカチオン特異性を評価しました。その結果、カチオン排出・選択性には MrpA・MrpD がともに関与し、金属カチオンが MrpA と MrpD の境界面で排出されることが示唆されました。得られた構造機能相関をもとに今後 Mrp 阻害剤の開発が進められるものと伊藤氏は期待しています。

最後に環境浄化研究への取り組みについて、特に微生物のセシウム (Cs) 取り込み能や耐性について紹介頂きました。セシウムは微生物の生育を阻害するほか、Cs<sup>137</sup>は放射性汚染の主要核種です。Cs がもたらす微生物の生育阻害は主に、Cs<sup>+</sup>が K<sup>+</sup>輸送系を介して細胞内へ流入するが、排出系が K<sup>+</sup>特異的であるため、結果として細胞内の K<sup>+</sup>が不足することに起因します。*Microbacterium* sp. TS-1 株はハエトリグモから単離された至適生育 pH が 9.0 の好アルカリ性細菌で、顕著な Cs<sup>+</sup>耐性を示します。したがって本菌には強力な Cs<sup>+</sup>排出機構が存在するか、あるいは細胞内 Cs<sup>+</sup>を効率よく吸着・無毒化する機構を有することが示唆されます。伊藤氏は TS-1 株の Cs<sup>+</sup>耐性機構の解明を目指し、Cs<sup>+</sup>感受性を示す変異体とそれらに対する復帰変異株を取得し、これらの全ゲノム配列を比較することにより、MTS1-00475 遺伝子を同定しました。本タンパク質のアンチポート活性を評価したところ、Cs<sup>+</sup>に対する見かけ上の Km 値は比較的高いものの、高い Cs<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>アンチポーター活性を示しました。このような活性を示すタンパク質は今まで知られておらず、伊藤氏は同タンパク質を Cs<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter (CshA) と命名しました。今後は CshA の Cs<sup>+</sup>に対する親和性を上げるとともに *cshA* 遺伝子を異種生物内で発現し、Cs<sup>+</sup>耐性を付与することも期待されます。また CshA をもつ反転小胞を利用すれば、溶液中から Cs<sup>+</sup>を特異的に濃縮・隔離することも想定でき、Cs<sup>+</sup>回収技術への展開も期待できます。

上記手法を利用することにより、Mg<sup>2+</sup>の輸送に関与すると考えられる *mgt* 遺伝子も TS-1 株の Cs<sup>+</sup>耐性に関与することがわかりました。そこで種々の Mg<sup>2+</sup>濃度存在下で TS-1 株の Cs<sup>+</sup>耐性を評価したところ、驚くべきことに Mg<sup>2+</sup>を添加するだけで TS-1 株の Cs<sup>+</sup>耐性が大幅に向上しました。重要なことに、この現象は TS-1 株に限ったものではなく、広い範囲の細菌に共通に観察される現象でした。Mg<sup>2+</sup>のこのような効果はいままで報告されておらず、Cs<sup>+</sup>取り込み能が高いが、Cs<sup>+</sup>耐性の低い生物に Mg<sup>2+</sup>を添加することにより、これらの Cs<sup>+</sup>回収能を高めることができると考えられます。このように好アルカリ性細菌の環境適応機構を理解することにより、新しい微生物機能、特に金属カチオンの輸送に関与する微生物機能や新しい生命現象が示され、新しい技術シーズ創出への展開も提案されました。

## 講演 2. 好熱菌に心を奪われて半世紀

共和化工株式会社環境微生物学研究所 顧問 / 東京工業大学 名誉教授 大島泰郎 氏

大島氏は我が国の好熱菌研究の開拓者であり、50年以上の間、*Thermus* を中心に好熱菌の生化学、生理学などに関する研究を牽引してきました。本講演では好熱菌研究の歩み、好熱菌由来生体分子の耐熱化機構、現在の自身の研究と同分野の今後の展望についてお話し頂きました。



伊豆峰温泉から分離された *Thermus thermophilus* は高度好熱性の細菌で、85℃という高温においても生育します。同種の細菌は北米などの温泉からも単離され、広く分布することが知られています。*T. thermophilus* は natural competence (特殊な処理なく外来の DNA を取り込み形質を転換する) を示し、遺伝子操作が容易です。系統学的解析から好熱菌は始原的な生物として認識され、生命の誕生・進化を研究する上で恰好の対象です。また熱に安定な酵素、核酸、生体膜などを有し、応用展開も期待されます。好熱菌由来酵素の高度の安定性を利用した技術としては耐熱性 DNA ポリメラーゼを利用した PCR 法の開発がよく知られています。

生体分子の耐熱化には主に3種の機構が考えられます。まずは生体分子の構造が熱安定性を示すように設計されている内在性の機構です。一方で、生体分子自身の安定性が不十分であるが、ポリアミンや二価金属カチオンなどの保護因子が結合することにより安定性が向上する機構もあります。最後に、生体分子がメチル化、チオ化、リン酸化されるなど、修飾により安定化する場合も知られています。

タンパク質の場合は、自身の構造が安定性を示すように設計されている場合が多く、好熱菌由来タンパク質における subunit あるいはドメインなどの構造ユニット間の相互作用が常温生物由来タンパク質と比較して強化されています。またタンパク質内部の疎水性相互作用が強く、折り畳められた構造と変性状態の構造間のエネルギー差を大きくしています。その他に、 $\alpha$ ヘリックスの側鎖同士の相互作用による安定化、ループ構造の短縮化などの機構もあります。

保護因子の代表的な分子としてポリアミンが挙げられます。ポリアミンとは、1分子中にアミノ基を2つ以上含む脂肪族の化合物の総称です。常温生物には主にプトレシン、スペルミジン、スペルミンの3種が存在します。複数のアミノ基を持つことからポリアミンは強い塩基性を示し、核酸、タンパク質の酸性アミノ酸残基、膜脂質のリン酸基などと強固に結合します。したがってその作用は転写・翻訳、細胞の分裂に深く関与しており、活発に増殖している細胞内に多量に含まれています。*T. thermophilus* は多くの種類のポリアミンを有し、常温生物には見られない長鎖・分岐鎖ポリアミンを生産しています。*T. thermophilus* において、長鎖・分岐鎖ポリアミンを合成できない変異体は70℃において生育するが、78℃では生育できず、高温環境におけるポリアミンの重要性が示唆されました。ポリアミンの作用の重要性は無細胞転写翻訳系に対する活性化効果やDNAの脱プリン化の抑制効果においても認められました。

好熱菌の細胞膜脂質に関しても、好熱菌由来膜脂質分子は極性基に特徴があり、糖が結合していることが多いことがわかりました。また常温生物と比較して不飽和脂肪酸よりも融点が高い飽和脂肪酸が含まれる割合が高いことも判明しました。これらの違いにより、膜の流動性や相転移温度も高温環境に適したものになったと考えられます。tRNAの耐熱化についても、好熱

菌由来 tRNA は常温生物由来のものとは比べて水素結合が多く、また塩基部分・リボース環への多様な修飾を受けます。ポリアミンなどの保護因子の結合による安定化も確かめられています。

タンパク質・核酸・脂質など、好熱菌由来生体分子の耐熱化機構に関して、多くの知見が得られつつありますが、まだまだ多くの謎が残されています。例えば、ATP、NADH、S-アデノシルメチオニンなど代謝と深く関わる低分子化合物、グリセルアルデヒド3リン酸など代謝中間体などは高温領域で不安定であることが知られています。これらの生体分子が、いかなる機構によって好熱菌細胞内で安定化されているのか、現在の常識では説明できません。細胞内には自由に運動する水分子がほとんどないなど、大胆な発想の転換が必要かもしれません。

大島氏は新たに開始している研究についても紹介頂きました。プラスチックゴミ分解に関する研究を共和化工(株)において展開しており、ポリ乳酸(PLA)分解菌の探索とそれらの機能評価が進められています。一方、*T. thermophilus* MinC 変異体の細胞分裂異常から得られる“mini cell”や堆肥中に存在するサイズの小さい *Microbacterium* 細胞の機能解析や Spring8 の SACLA (Spring-8 Angstrom Compact Free Electron Laser) を利用した細胞全体の観察が進められています。最後に光エネルギーから化学エネルギーへの変換を担う高度好塩菌のバクテリオロドプシンに関する研究について説明がありました。ゲノム情報から、バクテリオロドプシンは好塩菌に限らず、微生物界に広く分布していることが判明し、*T. thermophilus* の一部の株にも存在することが明らかになりました。*T. thermophilus* 由来のバクテリオロドプシンは高度の安定性を示し、高塩濃度も要求しないことから、タンパク質工学的改変が比較的容易で、広い範囲の細菌に機能を発揮する形で導入できる可能性が期待されます。

## フリーディスカッション

両氏の講演で極限環境微生物の特殊能力が数多く紹介され、質疑応答も活発に行われました。生命を維持できる環境の限界に関する議論があり、アルカリ性については pH 12.5 を超えるとアミノ酸などの生体分子が分解されることから、それ以上のアルカリ性での生命維持は難しいと予想されました。一方で、酸性環境 (pH 3 以下) で生育する微生物の存在も知られており、我が国から分離されたものも多いようです。



好熱菌について、細胞内のポリアミン濃度とその制御について議論が交わされました。ポリアミンの細胞内含量は細胞の増殖フェーズによって大きく変動するようで、定常期に大幅に減少する(増殖期の 1/1000 程度にまで)ことが明らかとなっています。その必要性について、またそれは排出あるいは分解によってもたらされるのか、確固たる証拠は今のところないようです。

第2回創発セミナーでは極限環境生物の驚異の特殊能力に焦点を当てましたが、極限環境生物にはやはり驚くべき環境適応能力があることが改めて認識できました。今回は好アルカリ性細菌と好熱菌が取り上げられましたが、これら以外にも好冷菌、好圧菌、好酸性菌、好塩菌も存在し、我々が確認できている微生物機能はまだまだ氷山の一角に過ぎないということが実感できました。