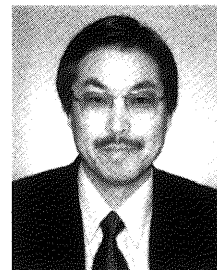


[生物工程学会誌 第80巻 第1号 2-9, 2002]

総合論文**極限環境微生物の探索と利用**

(平成13年度 日本生物工学会生物学賞受賞)

今中 忠行

**Isolation and Application of Extremophiles
—Monograph—**

TADAYUKI IMANAKA (*Department of Synthetic Chemistry and Biological Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University, Yoshida-honmachi, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501*) *Seibutsu-kogaku* **80**: 2-9, 2002.

There are a huge number of microorganisms in the extreme environment. For example, we can isolate many extremophiles such as hyperthermophiles, psychrophiles, and so on. The phylogenetic tree based on 16S rRNA or protein sequences shows that all organisms have a common ancestor. All organisms are divided into three groups, eucarya, bacteria, and archaea. *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 is a newly isolated hyperthermophilic archaeon from a hot spring at a wharf of Kodakara Island, Kagoshima, Japan. The optimum temperature for KOD1 cell growth is 95°C. The KOD1 strain possesses a circular genome, whose sequence has been determined (approximately 2076 kb). Most enzymes from KOD1 are extremely thermostable and the reason for thermostability was analyzed by determining the tertiary structure of those enzymes. A rapid and efficient method of amplifying specific DNA sequences by KOD1 DNA polymerase and characteristics of glutamate dehydrogenase, DNA ligase, and Rubisco are introduced here.

[**Key words:** extremophiles, hyperthermophiles, *Thermococcus kodakaraensis* KOD1, DNA polymerase, DNA ligase, glutamate dehydrogenase, Rubisco]

はじめに

今回、日本生物工学会から平成13年度「生物学賞」を頂きました。非常に光栄なことであり、関係の方々に御礼申し上げます。ほぼ同時期にバイオインダストリー協会賞も受賞したため、そちらにもすでに受賞論文を提出しています。どうしても内容的に重複する部分もあるのでご了解頂くようお願い致します。生物工学会ではより多くの誌面を頂戴しましたので、より幅広く、より詳しく記述してみたいと思います。

1. 水の惑星

地球が太陽系の1つの惑星として誕生したのは約45億年前であるといわれている。高温(約6000°C)の太陽か

ら順に水星(-180~500°C)、金星(100~500°C)、地球(-50~50°C)、火星(-133~27°C)と離れていくが、金星よりも太陽から遠く、火星よりも太陽に近い条件が幸いして「水の惑星」である地球が誕生した。ここは水が液体として存在するのに最も適した環境であるといえる。地球表面の海水は潮の干満を示すが、地下水も毎日数十センチメートルの単位で重力・引力の影響を受け変動していることが最近明らかにされている(図1)。また細胞の70%以上を占めるのは水であり、それゆえこの地球(水の惑星)上に原始生命体が出現することができたのであろう。水とともに誕生した生物は、水とともに進化してきたといえよう。

著者紹介 京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻(教授) 〒606-8501 京都市左京区吉田本町
TEL. 075-753-5568 FAX. 075-753-4703 E-mail: imanaka@sbchem.kyoto-u.ac.jp

<http://sbchem.kyoto-u.ac.jp/imhome/index.html>

1969年大阪大学大学院工学研究科修士課程修了, 工学博士 専門分野: 生物工程学

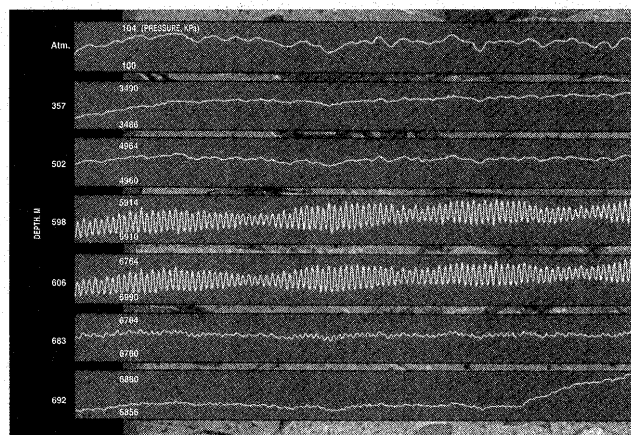


図1. 地下水位の変動

2. 極限環境微生物

原始生命体が誕生したのは約35億年前であるといわれている。今、地球の歴史を1年のカレンダーで表すとすれば、ちょうど3月に相当する。5月に原始藻類が、9月に真核生物が出現したし、11月、12月に多くの動植物が進化により出現したことを考えると、地球歴史上の大半が微生物により占められており、まさに「地球の先住民は微生物である」といえる。

さて今まで生活になじみのある微生物、あるいは各分野の研究対象となってきた微生物のほとんどは20～40°C、中性付近、豊富な栄養条件の下で活発に増殖するものであった。しかし最近になって、これらは地球上に存在する微生物のごく一部に過ぎないことが分かってきた。蛍光顕微鏡観察やPCR (polymerase chain reaction) 法を利用することにより、研究室で培養可能な微生物は土壌中の全微生物の1-10%程度であることが判明した。また、火山付近などの高温土壌・熱水環境、深海などの高圧環境、北極や南極域などの低温環境にもその環境に見事に適応した極限環境微生物 (extremophile) が多数生息していることも近年明らかになった。現在 extremophile としては thermophile (高温), psychrophile (低温), acidophile (酸性), alkalophile (アルカリ性), halophile (高塩濃度), barophile (高圧) の6種類が知られている。これらの極限環境微生物は従来の微生物に見られない特性を有し、基礎・応用両面で興味深い研究対象である。このような extremophile を含めると現在知られている微生物の生育環境条件の範囲は表1のようになり、地球上の微生物がいかに多種多様であるかを物語る。

表1. 微生物の生育環境条件

| | |
|--------|---------------------------|
| 温度 | -10°C ~ 113°C |
| 圧力 | ~ 1000 気圧 |
| pH | 1 ~ 11 |
| 浸透圧 | ~ 25% 食塩以上 |
| 光, 放射線 | 大腸菌の100倍以上の耐性 |
| 食べ物 | 石油, ベンゼン, トルエン, 炭酸ガス等でも利用 |
| 酸素 | なくても増殖する場合もある |

3. 地下は極限環境微生物の宝庫

今まで地球上の全生物は太陽エネルギーに依存しているといわれていた。光独立栄養生物が光合成を行うことにより無機物 (CO₂) を固定して有機物を合成し、それを従属栄養生物が利用して化学エネルギーを獲得しているからであった。現在の地球には光エネルギーが溢れ、酸素が存在する好気的環境である。これに対し、地下に光はなく、酸素のない嫌気的環境であることから、ここは生物のいない無機的世界であると長い間考えられてきた。しかし近年になって、地下の還元力をエネルギー源として生育する地下生態系の存在が明らかにされつつある (図2)。そこでわれわれは深部地下極限環境にも元気に生息する微生物が存在するであろうとの仮説に基づき、微生物の探索を試みることにした (図3)。すなわち温泉の元である熱水からは超好熱菌が、油田からは疎水環境に耐性がある石油菌が、また嫌気的雰囲気の中からはCO₂固定菌が分離できるであろうと考えた。

地下を奥深く掘り進んでいくと、1 kmあたり25~30°Cの割合で温度が上昇していく。現在、純粋分離された微生物の生育最高温度は113°Cであるが、高圧条件下では耐熱酵素の安定性が増すことや、微生物の化学組成から考えて、130°C程度で生育する微生物がいても不思議で

地下生物圏の酸化様式

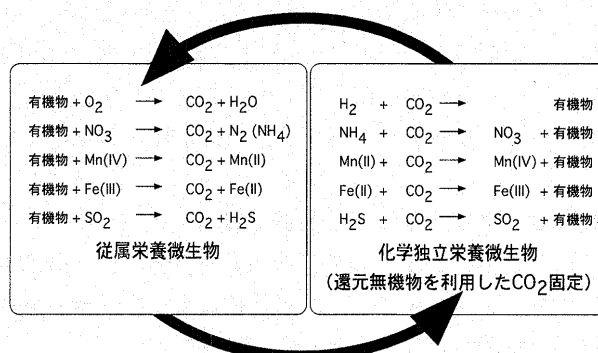


図2. 地下生物圏の酸化様式

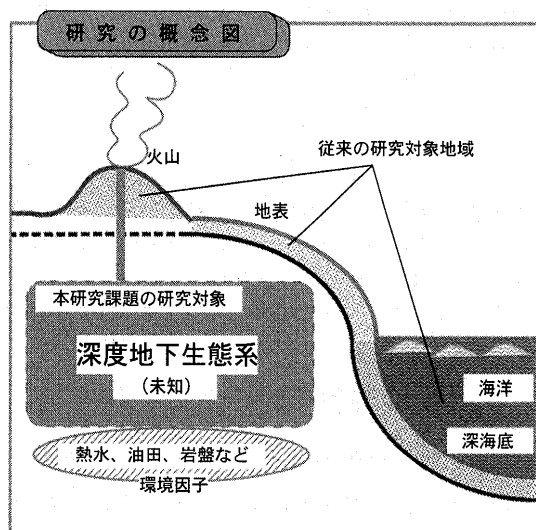


図3. 研究の概念図

はない。そうすれば、地下数 km は生物圏ということになる。地球の半径が 6400 km であり、生物圏が 6 km であるとすれば、海洋部を除いてその全容積は約 10 億 km³ になる。そこに生存する生物量は地表のそれと比較しても、決して無視できない量であることは間違いない。

4. 新規極限環境微生物の分離と同定

極低温でも生育する SN16A 株, KB700A 株 我々は国内の地下土壌サンプルから 0°C 以下の低温でも生育できる新規微生物の分離を試みた。比較的浅い地下環境から分離した SN16A 株は、-5°C から 37°C の温度範囲で生育し、新属新種の微生物である可能性が示唆された。また、KB700A 株 (図 4A) は地下 700 m の水サンプルから分離され、-10°C という生物にとって極限的な低温でも増殖することを見いだした。¹⁾

海底油田より分離した嫌氣的に長鎖アルコールを資化する M4 株 マレーシア沖海底油田 (海拔 -5000 m) より嫌気条件下で長鎖アルコール・アルデヒド類を高効率で分解・資化する M4 株の分離に成功した。嫌気条件下では M4 株は硝酸イオンを最終電子受容体とし、窒素を発生する脱窒菌であることが判った。M4 株には多数のアルコール分解系酵素が存在することが判明し、現在本菌の嫌氣的長鎖アルコール分解系の解明を目指している。

海底油田より分離した CO₂ 固定菌 同じくマレーシア沖海底油田より、高速度で CO₂ を固定し、生分解性プラスチックの原料であるポリヒドロキシアルカン酸を合成する細菌 MAL1 株 (図 4B) を分離した。

石油分解合成菌 HD-1 株 我々は静岡県相良油田よ

りさまざまな直鎖状炭化水素や芳香族化合物を効率よく分解する細菌 HD-1 株を分離した (図 4C)。²⁾ また、水素をエネルギー源、二酸化炭素を炭素源として培養した場合に HD-1 株の菌体内に炭化水素の蓄積を認めた。³⁾ このような特性を有する微生物はいままでに報告例はなく、HD-1 株内にさまざまな新規代謝系が存在すると考えられる。遺伝子解析により HD-1 株は α -proteobacteria に属する新属新種の微生物であることが判明した。

超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 株 我々は鹿児島県小宝島の硫気孔より超好熱始原菌 *T. kodakaraensis* KOD1 株を分離した (図 4D)。本菌は 65°C ~ 100°C という高温で生育する絶対嫌気性菌であり、硫黄呼吸や発酵を行って、アミノ酸や多糖類を分解・資化する。また、16S rRNA の比較により、KOD1 株は進化系統樹の根の近いところに位置するきわめて単純な生命体であることが示唆された。⁴⁾

好気性超好熱始原菌 *Pyrobaculum calidifontis* VA1 株 KOD1 株を含め、超好熱菌のほとんどは絶対嫌気性菌であるが、我々はフィリピン温泉より好気条件下で生育する超好熱菌 VA1 株を分離した (図 4E)。VA1 株は約 1 μ m の桿菌であり、大気条件下で温度 90 ~ 95°C、pH 7.0 で最も良好な生育を示した。また嫌気条件下では、超好熱菌には珍しく硫黄呼吸ではなく硝酸呼吸を行っていることが判った。系統解析の結果、VA1 株は *Pyrobaculum* 属に近縁でありながら、既存の菌種とは異なることが判明し、ラテン語の「熱い」=「calidus」および「泉」=「fontis」をもとに、本菌を *Pyrobaculum calidifontis* VA1 と命名した。

5. 超好熱菌の定義と分類

ここではまず超好熱菌に焦点を絞って説明することにしよう。超好熱菌 (hyperthermophile) とは一般に 90°C 以上でも生育する微生物の総称であり、1980 年代前半にドイツの Stetter らを中心にそれらの分離・解析が始まった。現在では、約 10 目、30 属、70 種の超好熱菌が同定されており、*Pyrolobus fumarii* の 113°C がいままで同定されている生物の生育温度上限である。超好熱菌は生物の進化系統樹の源流に位置しており、現存する生物の中で原始生命体に最も近いと考えられている (図 5)。実際、水素、硫化水素、硫黄、2 価鉄イオンなどをエネルギー源とし、二酸化炭素を唯一の炭素源として化学独立栄養増殖を示すものが多く、その生育条件は火山活動の盛んな原始地球環境 (高温、嫌氣的、無機) のシナリオと一致する。

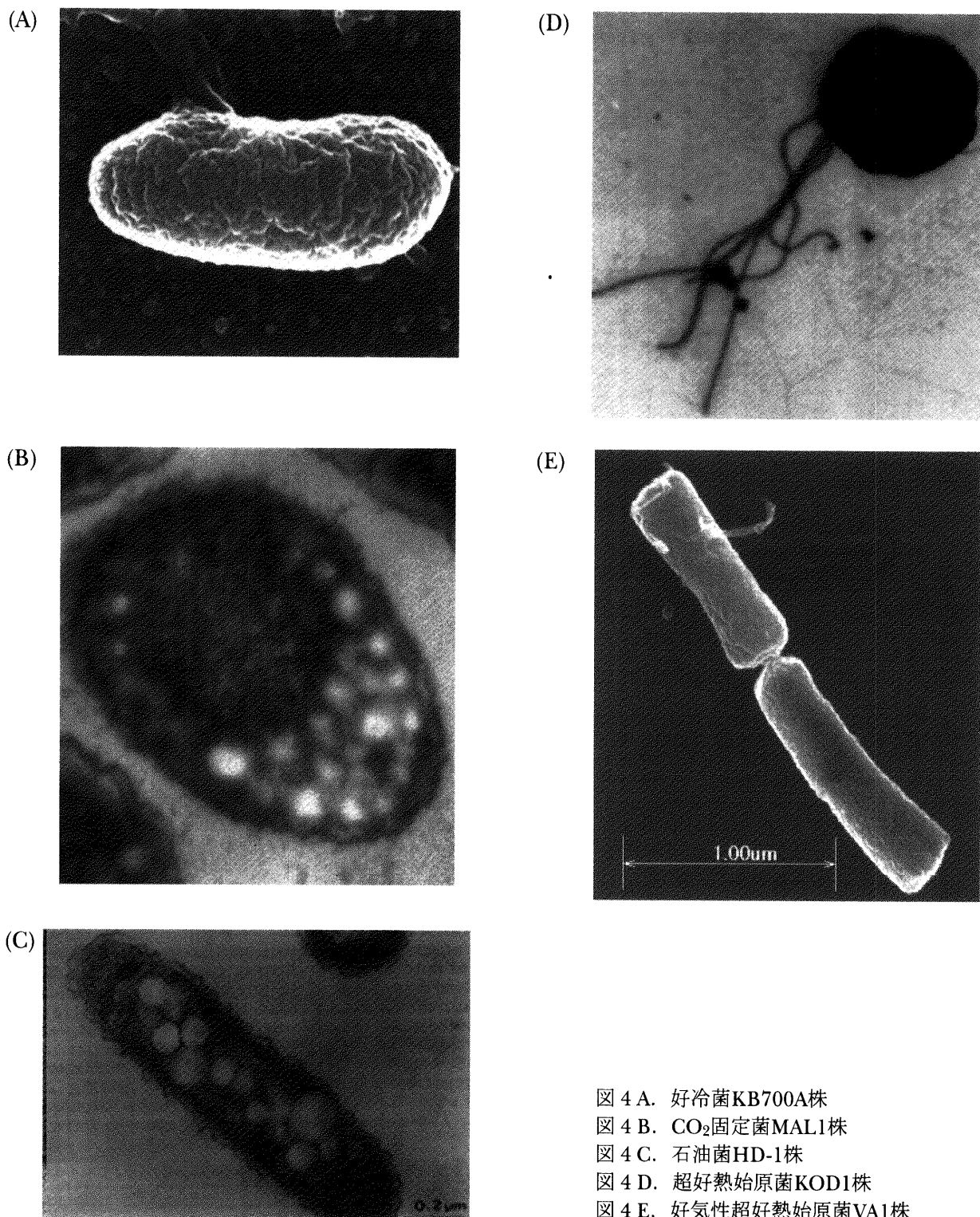


図 4 A. 好冷菌KB700A株
 図 4 B. CO₂固定菌MAL1株
 図 4 C. 石油菌HD-1株
 図 4 D. 超好熱始原菌KOD1株
 図 4 E. 好気性超好熱始原菌VA1株

超好熱菌の中では、細菌 (bacteria) に属するものと始原菌 (archaea) に属するものが存在する。前者の中では、*Aquifex* (95°C) が最も高い温度で生育する。後者の始原菌とは、系統学的に真核生物 (eucarya), 細菌と区別される第三の生物群であり、1977年に Woese らによって提唱された。始原菌はすべて細菌と同様に単細胞生物で

あり、核を持たないが、遺伝子中に intron が存在するなど、転写翻訳系はむしろ真核生物のものに近い。今までに同定された超好熱菌のほとんどが始原菌に属し、*Pyrolobus*, *Pyrodictium*, *Pyrobaculum*, *Methanopyrus*, *Pyrococcus* などは 100°C 以上で生育可能である。

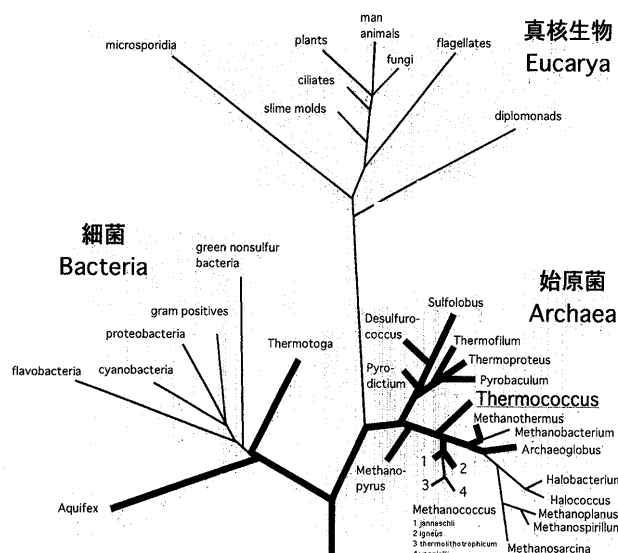


図5. 生物の系統樹

6. *T. kodakaraensis* KOD1株

我々は、前述したように鹿児島県小宝島の硫気孔より超好熱始原菌の1種 *T. kodakaraensis* KOD1株を分離した(図4D) (*Pyrococcus* を *Thermococcus* と再同定した)⁴⁾。本菌は65~100°Cで生育し、現時点では有機物をエネルギー源および炭素源とし、硫黄を電子受容体にした嫌氣的従属栄養生育のみが確認できている。また、今までに80種類以上の遺伝子を単離同定し、その大部分に関してはその発現産物の生化学的解析を行ってきた(表2)。また、イタリックで示したタンパク質はX線結晶構造解析がなされたものである。KOD1株由来の有用耐熱性酵素としては、*in vitro*での酵素の熱安定化効果や*in vivo*でのタンパク質可溶性効果を示すmolecular chaperonin, PCR技術に必須の耐熱性DNA polymeraseなどは遺伝子工学の分野で多くの研究者に利用されている。また、糖質関連酵素もamylaseをはじめとして数多く同定され、特にβ-1,4結合を切断するβ-glycosidaseとchitinaseは今後、celluloseやchitinなどのバイオマスの有効利用に貢献す

るものと期待している。

7. 超好熱菌の染色体DNAはなぜ安定なのか？

DNAの二本鎖は水素結合で維持されているため、高温環境では一本鎖に解離するのではないかという素朴な疑問が生じるであろう。KOD1株には2種の塩基性ヒストン様タンパクが存在し、これが負に荷電しているDNAに結合することにより、ヌクレオソーム様複合体を形成してコンパクト化することにより安定化している。さらにポリアミンがこれに結合して安定化を促進していることも明らかにできた。なおアセチル化されたポリアミン(アセチルポリアミン)はヌクレオソーム様複合体への結合能が弱いので、脱アセチル化酵素の働きにより得られたポリアミンがより強固に結合できるようになっている(図6)⁵⁾。一般的に超好熱菌の細胞内K⁺イオン濃度は常温菌の場合よりはるかに高いので、二本鎖DNAの安定化にも貢献していることは間違いない。実際DNAの融解曲線を調べるとこれらの特性が明らかに示されている(図7)。

8. 耐熱性酵素の成熟化には高温環境が必要

我々はKOD1株のglutamate dehydrogenase (GDH)の

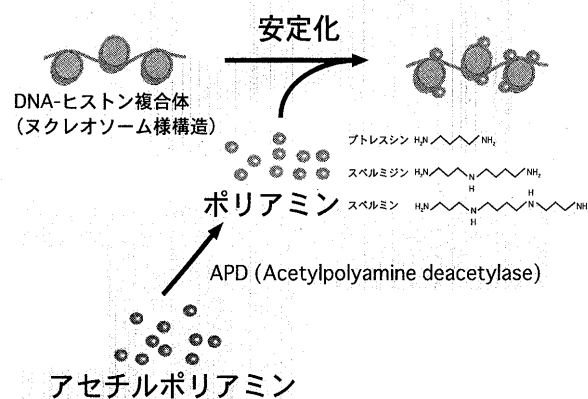


図6. DNAの安定化機構

表2. 生化学的解析を行っている主な組換え型酵素(イタリックで示すタンパク質は立体構造も解明されている)

| | |
|----------|--|
| 基本代謝 | <i>Rubisco</i> , Glutamate dehydrogenase, Aldolase, Glycerol kinase, Pyruvate kinase 他6種 |
| エネルギー代謝 | Ferredoxin, Formate dehydrogenase 他4種 |
| 糖質関連酵素 | Chitinase, β-Glycosidase, α-Amylase, Cyclodextrin glucanotransferase, 4-α-Glucanotransferase 他2種 |
| DNA複製修復 | <i>DNA polymerase</i> , <i>Homing endonuclease</i> , Histone, DNA ligase, <i>Rec protein</i> , <i>O⁶-Methylguanine DNA methyltransferase</i> |
| アミノ酸合成など | Glutamine synthetase, Glutamate synthase, Anthranilate synthase, Tryptophan synthase, Indole pyruvate ferredoxin oxidoreductase, Ribose phosphate pyrophosphokinase 他18種 |
| 転写翻訳 | <i>Aspartyl-tRNA synthetase</i> , TATA-binding protein, TBP-interacting protein, <i>RNase HII</i> 他6種 |
| その他 | Lon protease, Thiol protease, Flagellin, Subtilisin-like protease, Cell division control protein A 他11種 |

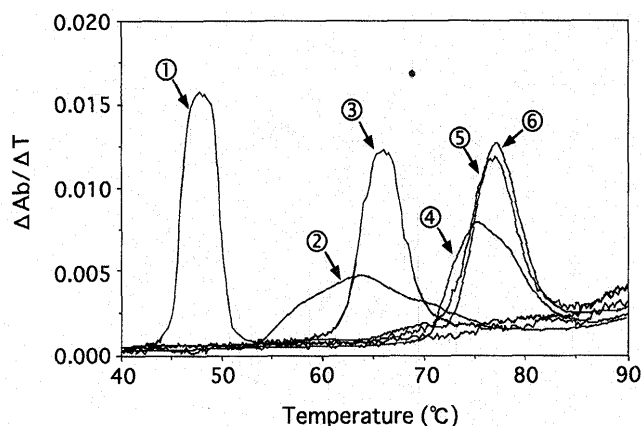


図7. DNAの融解曲線 ①DNAのみ, ②HpkA (35 μ g), ③スペルミン (10 μ M), ④HpkA (35 μ g)+スペルミン (10 μ M), ⑤KCl (1.0 M), ⑥HpkA (35 μ g)+KCl (1.0 M). T_m 値: ① 47.5°C, ② 63.5°C, ③ 65.5°C, ④ 75.0°C, ⑤ 76.5°C, ⑥ 77.0°C.

研究を通じて, 超好熱菌由来タンパク質に普遍的な特性を発見した. すなわち, 常温菌由来のタンパク質は一般に熱により変性するのに対し, 超好熱菌由来の組換えタンパク質は熱により成熟していくことを明らかにした. KOD1株内の高温環境で合成されたGDHは6量体構造を有し, 高い比活性を示す. 一方, GDH 遺伝子を大腸菌を宿主として発現させた場合では, 天然型のGDHと比べて酵素活性が低く, 構造の異なる単量体タンパク質が得られた. そこで70°C, 20 minの熱処理を施すと組換え型GDHは比活性, 立体構造ともに天然型のGDHに近づくことが明らかとなった. また, 一度熱処理を行うことにより, 本酵素は低温域でも天然型GDHと類似した挙動をした.⁶⁾このような特徴はGDHのみならず, 解析した超好熱菌由来酵素のすべてについて認められた. 以上のことから, 耐熱性タンパク質の成熟化には熱が重要であり, それは熱による酵素タンパク質の不可逆な構造変換に起因することが判明した (図8).

9. 構造解析に基づいた超好熱菌由来タンパク質の耐熱性機構の解明

超好熱菌由来タンパク質が示す高度な耐熱性は, タン

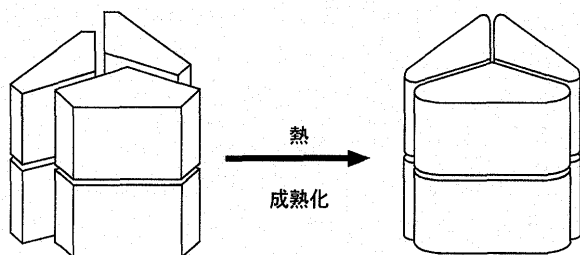


図8. 耐熱性酵素の成熟化

パク質科学の基礎分野のみならず, 酵素を利用する様々な応用分野から注目を集めている. 我々は多数のKOD1株由来酵素の立体構造を明らかにしており, それらの耐熱性機構を解明することができた. 代表的な例としてO⁶-methylguanine DNA methyltransferase (*Tk*-MGMT)が挙げられる. *Tk*-MGMTとその大腸菌由来酵素 (AdaC)の立体構造を比較すると, *Tk*-MGMTには α -helixを安定化するhelix内イオン結合が多数存在することが判明した.⁷⁾また, タンパク質全体の構造を安定化するhelix間イオン結合も多く存在していた. 大腸菌由来AdaCにはこのようなイオン結合は少なく, 超好熱菌由来酵素は多数のイオン結合やイオン結合ネットワークにより高度な耐熱性を発揮していることが分かった. これは前述のGDHにおいても同様であり, 生化学的にも証明することができた. すなわち, GDH内に存在するイオン結合ネットワークを壊すような部位特異的変異を導入した場合には, 変異酵素の熱安定性が大きく低下した. 逆にイオン結合を増加させた変異酵素の耐熱性は上昇した.

10. 新しい構造や機能特性を有する酵素の発見

Rubiscoはすべての植物・藻類・藍藻に存在し, 二酸化炭素を有機物に固定する重要な役割を担っている. Rubiscoは地球上で最も多量に存在する酵素であり, 本酵素の改良は地球温暖化や食糧問題の解決に大きく貢献すると期待されている. 今まで原始生命体に近い始原菌はRubiscoを有しないと考えられてきたが, 我々はKOD1株内に高い炭酸固定能を有するRubiscoが存在することを発見した.⁸⁾本酵素 (*Tk*-Rubisco)は従来のRubiscoと比較して40倍も高い活性を有し, 二酸化炭素に対する特異性もきわめて高いことが判明した. *Tk*-Rubiscoは構造的にも新規であり, 前例のない五角形型10量体構造をとっていた (図9).^{9,10)}現在は本酵素の生理的役割の解明とともに, 植物などの光合成生物への導入を進めている.

11. 有用酵素の利用

Polymerase Chain Reaction (PCR法)は遺伝子操作技術にもはや不可欠な技術の1つとなっており, その応用は医療, 環境, 食糧などさまざまな分野に及んでいる. 現在, PCR法に求められている改良点は増幅時間の短縮, 誤増幅の防止, 長いDNA断片の増幅である. 特に臨床検査, 食品検査では速く, 正確にDNAを合成するDNA polymeraseが要求されている. 我々はKOD1株のDNA polymerase (KOD DNA polymerase)の機能解析を行った結果, 本酵素は従来酵素と比較してDNAの合成

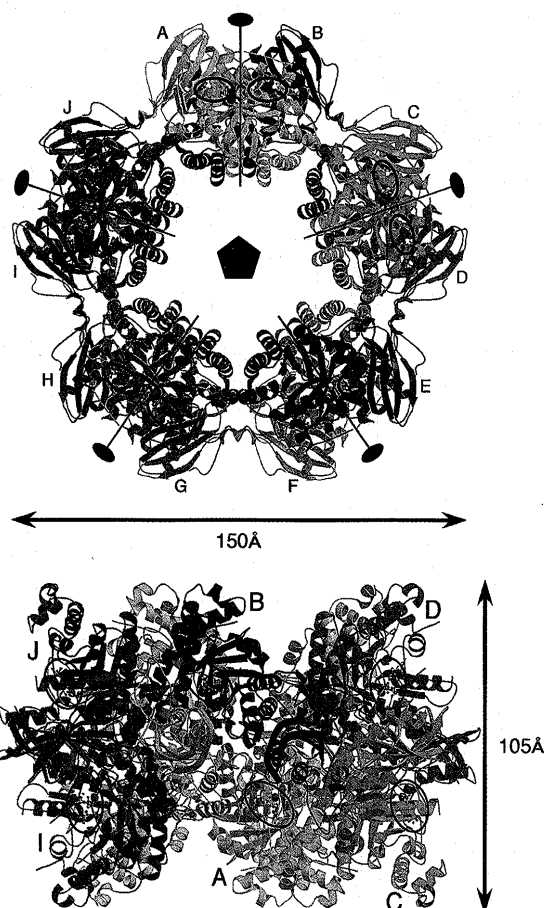


図9. Rubiscoの立体構造 (上 top view, 下 side view)

速度が速く、長い DNA を合成する能力も高いことを見いだした。¹¹⁾ 実際、KOD1株の DNA polymerase を用いると、従来の *Taq* 酵素で2時間かかっていた PCR の反応時間を約25分に短縮できた。また、KOD DNA polymerase の 3'→5' exonuclease 活性を欠失させた改変型酵素と野生型酵素とを最適な割合で混合することにより、よりすぐれた反応効率・伸長性を得ることができた。さらに KOD DNA polymerase の抗体を用いることにより、PCR 反応の初期に見られる誤増幅を抑え、きわめて正確で効率の良い DNA 増幅系を確立することができた。¹²⁾ 本システムは東洋紡績社から「KOD-Plus-」システムとして上市中であり、また Life Technologies/GIBCO BRL 社より「Platinum™ Pfx DNA polymerase」として、また Novagen 社から KOD HiFi DNA polymerase として欧米各国で販売されている。最近我々はさらに KOD DNA polymerase の結晶化・X線構造解析を行い、その立体構造を決定した。¹³⁾ 詳細な立体構造に基づいて、本酵素の伸長反応の速さ、複製能力の正確さなどがどのような構造に起因するかを解明することができた(図10)。

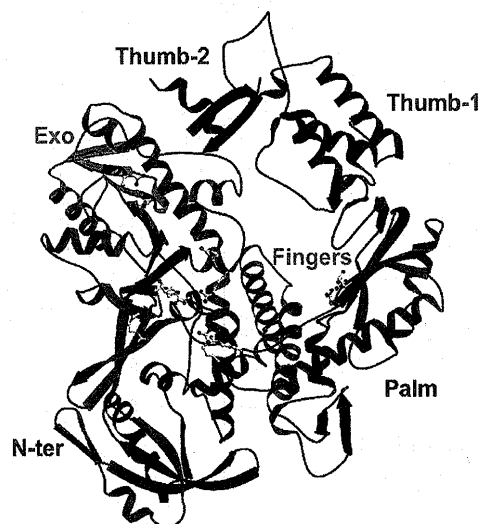


図10. DNA polymeraseの立体構造

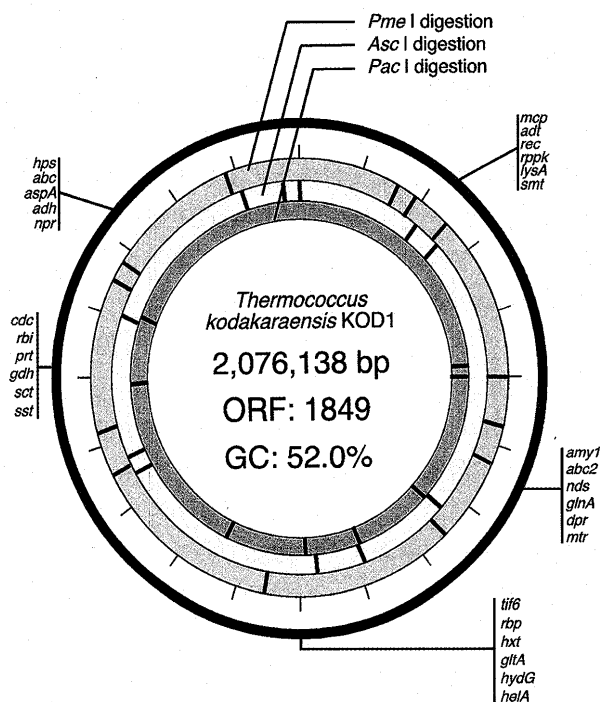


図11. KOD1株のゲノム構造

また、DNA polymerase 以外にも多数の有用耐熱性酵素を同定解析している。DNA ligase は2つの DNA 断片の末端を結合させる反応を触媒し、本酵素も遺伝子組換え技術の中で不可欠な酵素である。従来から使用されている細菌やファージ由来酵素のほとんどが熱に弱く、不安定なものであるが、KOD1株の DNA ligase (*Tk-Lig*) は30°Cから100°Cにおいて高い DNA ligase 活性を示した。¹⁴⁾ さらに *Tk-Lig* の nick 部位における基質 (base-pairing) 特異性は興味深く、3'末端に対しては厳密な塩

基対形成が必要であったが、5'末端に対しては基質特異性が甘いことが判明した。このような特徴をもつ DNA ligase は他に報告例はなく、1塩基置換 (SNPs) 検出への本酵素の応用が期待される。糖質関連酵素としては、デンプンなどに見られる α -1,4 結合を切断する α -amylase や環化反応を触媒して cyclodextrin を合成する cyclodextrin glucanotransferase, 転移反応を触媒する 4- α -glucanotransferase について生化学的諸性質を明らかにしている。セルロースやキチンに見られる β -1,4 結合を切断する β -glycosidase や chitinase についても詳細な解析を行った。特に KOD1 株の chitinase には同一ポリペプチド鎖上に2つの chitinase 活性ドメインが存在し、1つが endochitinase 活性、もう片方が exochitinase 活性を有した。これら2つの触媒ドメインの相乗作用により本酵素はきわめて高いキチン分解活性を示す。¹⁵⁾

12. *T. kodakaraensis* KOD1 株のゲノム解析と 遺伝子導入技術の開発

本研究を通じて我々は既に KOD1 株に関して100種類以上の遺伝子を解析し、80種類以上のタンパク質の詳細な生化学的性質を明らかにしてきた。KOD1 株は生物の進化系統樹の根に近いところに位置するきわめて単純化された生命体であり、生命の基本メカニズムを理解する上で、本菌は恰好の題材であると考えられる。また、KOD1 株は前述のように新しい特徴を有する酵素や応用可能な耐熱性酵素を多数生産している。このような背景のもと、我々は KOD1 株の全ゲノム解析を進めることにした。KOD1 株のゲノムは2,076,138塩基対からなり、予想通りきわめて短いものであった(大腸菌の40%程度)。また、遺伝子の数も少なく1849個であった(図11)。KOD1 株がこのような少ない数の遺伝子で生命を維持していることから、本菌の研究を通じて生命の基本原理の解明も実現可能と期待している。

ポストゲノム研究において最も重要な研究課題は機能未知遺伝子の生理的役割を解明することである。DNA chip による網羅的遺伝子発現解析、proteome による網羅的タンパク質解析はこの目的のために有効な解析法である。我々もこれらの手法を用いて研究を進めているが、最近、もう1つ重要なシステムの構築に成功した。すなわち KOD1 株ゲノム上の任意の遺伝子を特異的に破壊する技術である。これにより機能未知遺伝子を破壊してその影響を解析することにより、その生理的役割を明らか

にすることが可能となった。KOD1 株がきわめて単純な生命体であること、およびゲノム情報・DNA chip 技術・proteome 技術・遺伝子破壊技術がすべて確立されていることにより、数年以内に本菌の全遺伝子の機能解明も期待できる。

この一連の研究は、京都大学大学院工学研究科の跡見晴幸助教授、江崎聡助手、福居俊昭助手、同理学研究科の三木邦夫教授、大阪大学大学院工学研究科の甲斐泰教授、金谷茂則教授、森川正章助教授、藤原伸介助教授、春木満助手、北陸先端科学技術大学院大学材料科学研究科の高木昌宏教授、フランス CNRS/ULP の J.-C. Thierry 博士を始め多くの先生方、ポスドク、院生、実験協力者の皆様のお陰で達成されたものであり、ここに謝意を表します。

文 献

- 1) Rashid, N., Kikuchi, H., Ezaki, S., Atomi, H., and Imanaka, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **87**, 746-751 (1999).
- 2) Morikawa, M. and Imanaka, T.: *J. Ferment. Bioeng.*, **76**, 280-283 (1993).
- 3) Morikawa, M., Iwasa, T., Yanagida, S., and Imanaka, T.: *J. Ferment. Bioeng.*, **85**, 243-245 (1998).
- 4) Morikawa, M., Izawa, Y., Rashid, N., Hoaki, T., and Imanaka, T.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 4559-4566 (1994).
- 5) Higashibata, H., Fujiwara, S., Ezaki, S., Takagi, M., Fukui, K., and Imanaka, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **89**, 103-106 (2000).
- 6) Rahman, N.Z.A., Fujiwara, S., Takagi, M., and Imanaka, T.: *Mol. Gen. Genet.*, **257**, 338-347 (1998).
- 7) Hashimoto, H., Inoue, T., Nishioka, M., Fujiwara, S., Takagi, M., Imanaka, T., and Kai, Y.: *J. Mol. Biol.*, **292**, 707-716 (1999).
- 8) Ezaki, S., Maeda, N., Kishimoto, T., Atomi, H., and Imanaka, T.: *J. Biol. Chem.*, **274**, 5078-5082 (1999).
- 9) Maeda, N., Kitano, K., Fukui, T., Ezaki, S., Atomi, H., Miki, K., and Imanaka, T.: *J. Mol. Biol.*, **293**, 57-66 (1999).
- 10) Kitano, K., Maeda, N., Fukui, T., Atomi, H., Imanaka, T., and Miki, K.: *Structure*, **9**, 473-481, (2001).
- 11) Takagi, M., Nishioka, M., Kakihara, H., Kitabayashi, M., Inoue, H., Kawakami, B., Oka, M., and Imanaka, T.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 4504-4510 (1997).
- 12) Mizuguchi, H., Nakatsuji, M., Fujiwara, S., Tagaki, M., and Imanaka, T.: *J. Biochem.*, **126**, 762-768 (1999).
- 13) Hashimoto, H., Nishioka, M., Fujiwara, S., Takagi, M., Imanaka, T., Inoue, T., and Kai, Y.: *J. Mol. Biol.*, **306**, 469-77 (2001).
- 14) Nakatani, M., Ezaki, S., Atomi, H., and Imanaka, T.: *J. Bacteriol.*, **182**, 6424-6433 (2000).
- 15) Tanaka, T., Fukui, T., and Imanaka, T.: *J. Biol. Chem.*, **276**, 35629-35635 (2001).