

好熱菌の低温ストレス耐性

秀瀬 涼太・藤原 伸介*

醗酵産業で活躍する微生物は、さまざまな環境ストレスにさらされる。温度、乾燥、浸透圧、pH、低栄養など微生物の生育環境が変化する。これら因子による環境変化は、微生物の生育阻害および細胞死を引き起こす場合がある。一方、微生物はさまざまな環境ストレスに対して、細胞内の遺伝子およびタンパク質の発現や酵素活性などを調節することで適応する。微生物のさまざまなストレス環境適応機構の知見を得る事が、産業上有用な微生物の育種・開発に結びつくものと思われる。好熱菌 (Thermophiles) は、55°C以上で生育可能な微生物の総称である。好熱菌の生育を脅かす最大のストレス要因の一つは、やはり低温であろう。一方、好熱菌は分子系統的に生命の起源に近い生物と考えられるため、好熱菌の低温への適応進化こそ現存する多くの生命が繁栄する要因であったと考えられる。そのため、好熱菌の低温ストレス耐性機構を解明することは、微生物のストレス応答機構の一例を得るのみならず、生命進化の謎を紐解く一つの重要な鍵になる。本稿では、筆者らが見いだした好熱菌の低温適応機構の概要を中心に、その機構の進化的な意義を解説する。

好熱菌の系統的位置付け

生物間の進化を系統的に解析するために、利用されているのは16SリボソームRNA (16S rRNA) の配列やリボソームRNA間の配列 (ribosomal intergenic spacer region, 一般的に16SrRNA-23SrRNA間の配列) である。これらはタンパク質合成に関わる重要な分子であり、進化速度が比較的遅いため、種間において高い相同性を示す。Woeseらはすべての生物を3つの分類単位 Domain Eucarya (ユーカリア), Domain Bacteria (バクテリア), そしてDomain Archaea (アーキア) のいわゆる three-domains tree に分類することを提唱した¹⁾。一方、Lakeらは、アーキアの1分類群であるクレンアーキオータ門がユーカリアの祖先となったとするエオサイト説を発表した²⁾。つまり、Woeseらによる単系統群 (monophyletic archaea) 仮説とLakeらによる側系統群 (paraphyletic archaea) 仮説の対立である (図1A, B)³⁾。後者の仮説を支持するものとして、クレンアーキオータ門 (エオサイト), タウムアーキオータ門, コルアーキオータ門,

アイグアーキオータ門を含むアーキアのうち、ユーカリアの細胞骨格形成に必要なアクチンやチューブリンのホモログや、転写や翻訳に関わるタンパク質のホモログをもつアーキアが存在する³⁾。しかしながら、これら二つの仮説のどちらかを支持する明確な証拠は未だ得られていない。

好熱菌 (thermophiles) のうち、80°C以上でも生育可能な微生物は超好熱菌 (hyperthermophiles) と呼ばれる。超好熱菌は、温泉や海底の熱水噴出口、硫気孔から分離されている。現在分離されている超好熱菌は、2種のバクテリア (*Thermotoga* 属, *Aquifex* 属) を除き、すべてアーキアである。超好熱菌の多くは嫌気性だが、*Sulfolobus* 属, *Pyrobaculum* 属など好気性の超好熱菌も分離されている。超好熱菌は例外なく進化系統樹の根に近いところに現れる (図1C)。つまり、超好熱性のアーキアやバクテリアは、それぞれのドメインの起源にもっとも近い生物と位置づけることができる。また、Akanumaらは、ほとんどすべての生物がもつヌクレオチド二リン酸キナーゼ (NDK) を対象に、進化系統解析と遺伝子工学によって、全生物の共通祖先がもっていたと考えられる祖先型NDKを復元した。祖先型NDKは100°C以上まで変性しない高い耐熱性をもつタンパク質であることが明らかになった⁴⁾。これら事実、初期生命が高温環境下で誕生したことを強く示唆する。

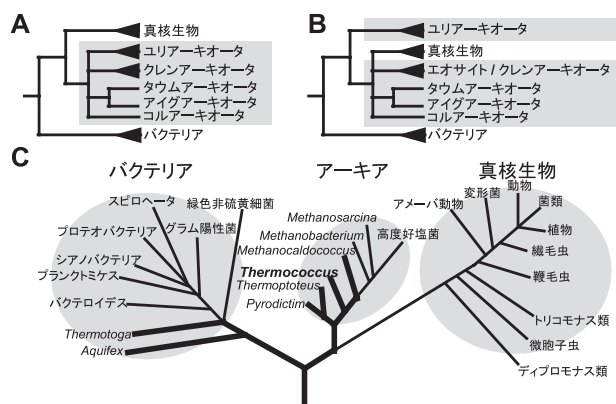


図1. 生命の進化系統樹。A: Woeseらによる3ドメイン仮説。B: Lakeらによるエオサイト仮説。四角内の網掛けは、アーキアを示す。C: 生物進化における各ドメインの位置づけ。文献¹⁾を一部改変。太線は超好熱菌を示す。

*著者紹介 関西学院大学大学院理工学研究科生命科学専攻 (教授) E-mail: fujiwara-s@kwansei.ac.jp

好熱菌の低温ストレス応答

低温はすべての生物に、酵素反応効率や膜間輸送効率の低下、膜の流動性の低下、核酸分子の二次構造の安定化による複製・転写・翻訳の阻害といった物理化学的束縛を課す。多くの微生物のゲノム配列情報がデータベースに公開されているが、微生物の生育温度が下がるにつれて、ゲノムサイズが大きくなる傾向がある。たとえば超好熱菌の多くは2 Mbp程度のゲノムサイズであるが、これは大腸菌や緑膿菌の半分にも満たない。低温が引き起こす物理化学的束縛から解放されるために、好熱性の始原生命は遺伝子を増やし、機能的多様性を獲得していったと思われる。

低温における細胞の膜流動性の維持のため、微生物（好熱菌にかかわらず）は、膜脂質の組成を変化させている。たとえば、超好熱性メタン生成アーキアである *Methanocaldococcus jannaschii* において、生育至適温度 75°C では、テトラエーテル型や大環状ジエーテル型の脂質が主な膜脂質組成であるが、低温 (47°C) ではジエーテル型脂質へと変化する⁵⁾。これは、ジエーテル型脂質が増加すると、低温における膜流動性が維持されるためである。膜脂質組成の温度依存的な変化は、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* でも確認されている⁶⁾。他方、核酸分子やタンパク質の正常な構造を維持するためには、分子シャペロンが必要である。バクテリアの低温応答の代表的な分子は、cold-shock protein (Csp) であろう。Csp は RNA 結合性のシャペロンとして働き、低温での遺伝子の発現とタンパク質合成を可能にする。Csp 遺伝子は好熱性バクテリアである *Thermus thermophilus* や *Thermotoga maritima* にも保存されている。好熱性バクテリアにおいても、Csp の RNA 結合性シャペロンとしての機能が、低温（生育下限温度）適応に重要である⁷⁾。

Thermococcus kodakarensis の低温ストレス応答

ユリアーキオータ門に属する超好熱性アーキアの *Pyrococcus* 属と *Thermococcus* 属はともに Thermococcales 目の絶対嫌気性の従属栄養微生物であり、分子系統的にも近縁種である。*Thermococcus* 属 (50～103°C で生育) は *Pyrococcus* 属 (67～103°C で生育) に比べて低い温度でも生育する。比較ゲノム解析により *T. kodakarensis* には *Pyrococcus* 属にはない約 680 種類の遺伝子が存在することがわかった⁸⁾。*T. kodakarensis* には *Pyrococcus furiosus* に比べて同じ機能をもつ遺伝子（パラログ）が多い。*T. kodakarensis* は 85°C を至適温度として 60～93°C で生育する。*Pyrococcus* 属にはない遺伝子のうち、

分子シャペロン CpkA⁹⁾ や RNA ヘリカーゼ DeaD¹⁰⁾ などは低温 (60°C) 依存的に発現する。

T. kodakarensis が低温で生育するにはタンパク質の低温変性を防ぐ必要があり、CpkA は低い温度で変性する耐熱性タンパク質を特異的に認識し、再生していると予想される。実際、分子シャペロンの遺伝子 *cpkA* を破壊した株は、低温 (60°C) では生育が阻害される。CpkA が捕捉したタンパク質を網羅的に解析すると、CpkA パラログである高温 (93°C) 誘導型シャペロン (CpkB) が捕捉したタンパク質とは、構造的特徴が異なっていた。これは、両シャペロンの標的の認識機構には違いがあることを示している。興味深いことに、TIM (β/α)₈ barrel-fold や NAD(P)-binding Rossmann-fold domains をもつタンパク質は、CpkA に優先的に捕捉された。TIM (β/α)₈ barrel-fold をもつ TK0252 (*Tk-TrpC*) の *in vitro* での CpkA および CpkB の添加によるリフォールディング効果を調べたところ、変性された *Tk-TrpC* は低温誘導型シャペロン CpkA によってのみリフォールディングが促進され、高温誘導型の CpkB の作用を受けなかった (図2)。また、*cpkA* 破壊株はトリプトファン非存在下では、85°C では野生株と同様に生育したが、60°C では著しく生育が阻害された¹¹⁾。バクテリアの GroEL シャペロンは、TIM (β/α)₈ barrel をもつタンパク質を捕捉する。CpkA のカルボキシル基末端には、GroEL シャペロンにみられるグリシン-メチオニンモチーフをもつ。このような CpkA と GroEL との類似性から、超好熱菌の CpkA の獲得こそが、常温で繁栄できる生命の進化へと結びついたと考えられる。CpkA のもつ ATPase 活性の至適温度をさらに低くする点変異を導入した *T. kodakarensis* は、より低い温度でも生育できるようになる。これらの知見は CpkA が低温適応に重要な役割を強く示唆している¹²⁾。

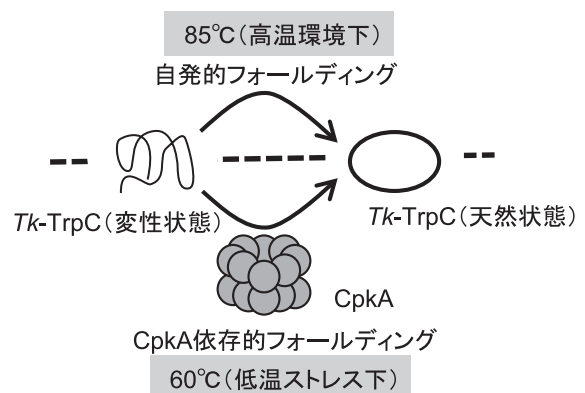


図2. *Tk-TrpC* (Indole-3-glycerol phosphate synthase) の異なる温度でのフォールディング経路。

特 集

低温依存的に発現する *Tk-DeaD* は低温 (60°C) で機能する RNA ヘリカーゼであり、ステム構造の RNA をほぐす反応を触媒する (unwind する)。*Tk-DeaD* の遺伝子を破壊した株は、低温 (60°C) で増殖後に溶菌することから、低温ストレスに対する *Tk-DeaD* の重要性を示唆している¹³⁾。低温ストレスに応答するためには、低温特異的に発現誘導する機構を備えていなければならない。大腸菌の場合、*csp* 遺伝子の長い非翻訳領域 (5'-UTR) の構造変化が、低温発現誘導に関与する。*Tk-deaD* 遺伝子は 158 塩基にも及ぶ非翻訳領域 (5'-UTR) をもっており、*Tk-deaD* 遺伝子もこの領域に依存した低温特異的な発現誘導がなされていると考えられていた。しかし実際に制御領域の探索を行った結果、低温誘導を支配したのは、5'-UTR ではなく、*Tk-deaD* 遺伝子の SD 配列 (Shine-Dalgarno 配列: 16S rRNA が結合するリボソーム結合部位) と開始コドンに挟まれたアデニンの連続する AAAAA 配列であった¹³⁾。この配列を、恒常的に発現するグルタミン酸脱水素酵素 (GDH) 遺伝子の SD 配列と開始コドンの間に挿入することで、*gdh* 遺伝子に低温誘導性を付与できた。転写開始部位の下流に、転写の制御領域が存在するのはきわめて興味深い。この現象は大腸菌のトリプトファン合成系オペロンでみられるリーダー領域のアテニューエーターを想起させる。実際に高温では *Tk-deaD* の開始コドンまで転写されない短い長さの RNA 分子が検出されている。温度が高くなるにつれて mRNA が鋳型 DNA から解離しやすくなるとすれば、*Tk-deaD* 遺伝子の発現調節は、転写終結効率の違いであると考えられる。実際、この領域に一つでも G や C が入ると誘導性は見られなくなる。おそらく G や C により mRNA と鋳型 DNA のハイブリッドが安定化し、85°C でも転写終結しないのであろう。一方、ATTTT や TTTT という配列でも低温依存的な発現は認められる。以上の結果から、超好熱菌の低温依存的な発現は、構造遺伝子の手前で起こる温度依存的転写終結によりなされていると推察できる (図3)。異なる温度で培養した *T. kodakarensis* のトランスクリプトーム解析の結果、至適生育温度 (85°C) と比べて低温 (60°C) で、50 遺伝子で4倍以上の発現量の増加がみられた。そのうちの40 遺伝子で A または T に富む配列が SD 配列から開始コドンまでに認められた。この結果は、*Tk-deaD* 遺伝子でみられた低温誘導機構が、*T. kodakarensis* がもつ普遍的な低温誘導機構であることを示している。

低温環境での超好熱性アーキアの生存戦略

高温環境に特有の成分の代表は、元素硫黄 (分子式: S₈) であろう。筆者が環境中で元素硫黄の存在を再認識

する場所は、噴火口や硫黄泉の温泉郷である。自然にみられる元素硫黄は、主に火山噴火口から噴出する二酸化硫黄と硫化水素から生成する。初期地球大気では、一酸化炭素の量が二酸化炭素のそれより多く、酸素濃度が現在と比べてきわめて低かったため、強い紫外線が大気中に降り注いでいた。活発な火山活動で噴出する二酸化硫黄は紫外線などの作用により、硫化カルボニル (分子式: COS) へ変換される。25 億年前よりも前の地球は温暖であったと地質記録から明らかにされているが、温室効果作用がきわめて高い硫化カルボニルが初期地球の気候を温暖に保つのに重要なガスであったことが示唆されている¹⁴⁾。原始地球環境において二酸化硫黄より生成する元素硫黄は、初期地球大気の硫黄循環において重要な中間産物であった。このような高温・無酸素・硫黄が豊富な環境という地球環境は、超好熱菌の生育環境と一致している。実際、多くの超好熱菌は元素硫黄が豊富な環境から単離・同定されている。

硫黄はすべての生物に必須な元素である。チアミン、ビオチン、リボ酸などの含硫ビタミン、鉄硫黄クラスターやモリブドプテリンなどの含硫補因子、tRNA のチオヌクレオチドなどはすべての生物に普遍的に存在しており、生命維持に寄与している。バクテリアやユーカリアにおいて、それら含硫化合物への硫黄転移に、システインデスルフラゼ (CSD) が必須であることが知られている。CSD は、L-システインから L-アラニンと硫黄を生成するピリドキサル酵素である。硫黄脱離反応により CSD の活性中心システイン残基上に生成した

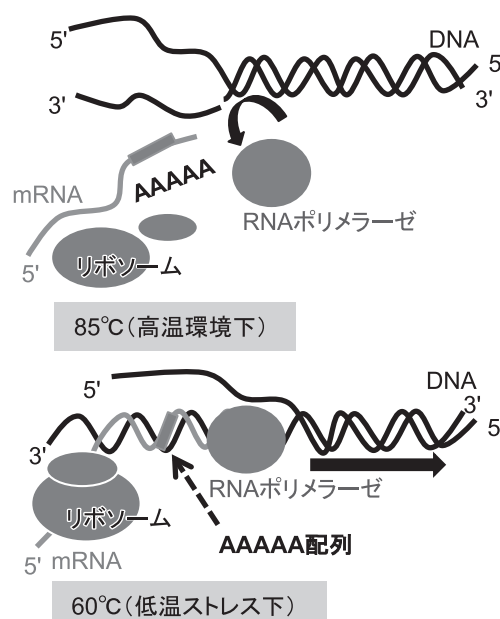


図3. 超好熱菌の温度依存的転写終結機構

CSD-S-SHの硫黄が、含硫化合物の硫黄源となる。ほとんどすべての常温性アーキアはCSDオルソログを有している。一方、ユリアーキオータ門の進化系統樹の根の近傍に位置する多くの超好熱性アーキアやクレナーキオータ門のアーキアではCSDオルソログを有していない種が多く存在している。*T. kodakarensis*は超好熱性アーキアの中では珍しくCSDを有する。*T. kodakarensis*は元素硫黄を最終電子受容体として呼吸を行う絶対嫌気性アーキアであるが、元素硫黄が存在しない環境でも糖（またはピルビン酸）を代謝しプロトン電子受容体として水素発生型呼吸を行うことで生育できる。*T. kodakarensis*のCSDの生理意義を調べるため、*Tk-CSD*遺伝子を破壊した。*Tk-csd*破壊株は、元素硫黄含有培地（+S⁰培地）では野生株と同等に生育した一方で、元素硫黄非含有ピルビン酸含有培地（-S⁰+ピルビン酸培地）では生育しなかった¹⁵⁾。さらに、-S⁰+ピルビン酸培地に元素硫黄を加えて生育を比較すると、元素硫黄含量の増加に応じて*Tk-csd*破壊株の生育は野生株と同等の生育まで回復した。次に、CSDに依存する含硫化合物を探索した。野生株と*Tk-csd*破壊株のそれぞれのモリブドプテリン含量、チアミン含量は培地成分によらず同等であった。一方、-S⁰+ピルビン酸培地に少量の元素硫黄を加えた培地で生育した野生株と*Tk-csd*破壊株では、野生株に比べて*Tk-csd*破壊株で鉄硫黄クラスター含有酵素の活性が顕著に減少した¹⁵⁾。この結果は、*T. kodakarensis*には、環境中の元素硫黄に依存および非依存の鉄硫黄クラスター生合成系が存在する事を示している。L-システインは、元素硫黄存在下では、鉄硫黄クラスター生合成に関与しないと考えられる。CSDの獲得によって元素硫黄がない環境での鉄硫黄クラスター生合成能を獲得できた結果、元素硫黄がない環境で本菌の生育が可能となったと考えられた（図4）。つまり元素硫黄を起点とした鉄硫黄クラスター生合成系を有していた原始アーキアは、CSDを獲得した事で、高温環境中の元素硫黄の要求性から脱し、それが代謝の多様化を促したと考えられた。

おわりに

80種以上の好熱菌の全ゲノム配列情報のデータベースが公開されているが、一次構造から推定できない機能未知遺伝子は多数存在する。しかしながら、好熱性バクテリア*T. thermophilus*をはじめ、*T. kodakarensis*や*Sulfolobus solfataricus*および*S. acidocaldarius*などの超好熱性アーキアでも遺伝子破壊系、機能相補系が確立され、それまで機能未知であった遺伝子の機能が明らかにされつつある¹⁶⁾。さらに、近年の転写産物、タンパク質、代謝産物を網羅的に解析するオミックス解析の進歩

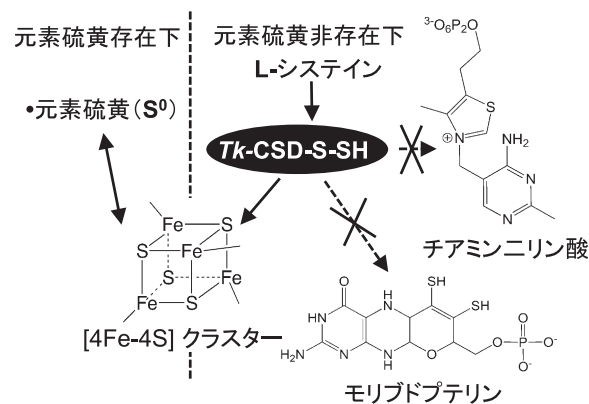


図4. 超好熱菌の硫黄転移系。CSD-S-SHは、元素硫黄非存在下で、鉄硫黄クラスター生合成の硫黄供給源である。元素硫黄存在下での鉄硫黄クラスター生合成は、CSDの活性に依存しない。

は著しく、これらはポストゲノム研究の中心を担っている。それらにより、好熱菌の低温ストレス応答を含む生命維持機構に関する知見が今後はさらに蓄積されると思われる。生命進化の謎を紐解くためには、異なる種間のオミックス解析データの比較解析によって、種間の類似性および異質性を統計的に分類することと、地球惑星科学の知見を踏まえて、生命が進化するうえでのその類似性および異質性の利点を考察することが重要になると考えている。

文 献

- 1) Woese, C. R. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4576 (1990).
- 2) Lake, J. A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 3786 (1984).
- 3) Williams, T. A. et al.: *Nature*, **504**, 231 (2013).
- 4) Akanuma, S. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 11067 (2013).
- 5) Koga, Y. et al.: *Microbiol. Rev.*, **57**, 164 (1993).
- 6) Matsuno, Y. et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 104 (2009).
- 7) Tanaka, T. et al.: *FEBS J.*, **279**, 1014 (2012).
- 8) Fukui, T. et al.: *Genome Res.*, **15**, 352 (2005).
- 9) Fujiwara, S. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 7306 (2008).
- 10) Shimada, Y. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **389**, 622 (2009).
- 11) Gao, L. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 3806 (2012).
- 12) Gao, L. et al.: *J. Bacteriol.*, **197**, 2642 (2015).
- 13) Nagaoka, E. et al.: *J. Bacteriol.*, **195**, 3442 (2013).
- 14) Ueno, Y. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 14784 (2009).
- 15) Hides, R. et al.: *Mol. Microbiol.*, **93**, 331 (2014).
- 16) Leigh, J. A. et al.: *FEMS Microbiol. Rev.*, **35**, 577 (2011).