

低温菌の低温環境への適応メカニズム

川本 純*・栗原 達夫

極地や深海、高山や氷河といった年間を通して5°C以下の低温に保たれている環境は地球上の生物圏の約80%を占める。このような低温環境では、水の粘性の上昇、可溶性分子の拡散速度の低下、化学反応速度の低下、膜流動性の低下などにより、生命を支える化学反応が円滑に進行しにくく、生命を維持することが困難である。近年、このような低温環境に低温菌や好冷菌と呼ばれる低温適応性の微生物群が生息しており、低温環境の物質循環に寄与していることがわかってきた。これらの低温適応微生物は地球上の広大な低温環境で生存可能であることから、地球環境に巧く適応した生物種といえ、低温環境で生じる物理化学的障害を克服するために、独特の進化を果たしたと考えられる。低温菌は地球上の低温環境における物質循環を担う以外に、低温保存した食品を腐敗させる食品変敗菌として我々の身近に存在している。本稿では、南極海水と食肉変敗製品より採取された2種の低温菌が低温環境下で生産するタンパク質や生体膜に着目し、低温菌の巧みな低温環境適応メカニズムについて解説する。

低温菌の好冷性酵素

低温環境であっても、常温性の生物と同様に細胞内で多様な化学反応が連続して進行することで生命活動が支えられており、多種多様な酵素が個々の生体反応を触媒している。低温ではあらゆる化学反応速度が低下するが、低温菌はさまざまな代謝系に関わる化学反応の速度をある程度維持するために、好冷性酵素と呼ばれる触媒能に優れた酵素を生産する。好冷性酵素の反応速度論的特徴、および構造的特徴はこれまでに多く報告されているが^{1,2)}、一般に好冷性酵素は常温以上で機能する類縁酵素と比較して、柔軟な構造をとることが知られている。柔軟な構造は高い触媒能を実現するために必要な構造と考えられている。一方、柔軟性の高さと、酵素の構造安定性はトレードオフの関係にあり、低温で柔軟性の高い構造を形成するために、構造不安定化をもたらす要素を多くもつことが好冷性酵素の構造的特徴となっている。

好冷性酵素については、低温での高い活性と構造不安定性の両面の特徴を活かしたさまざまな産業利用が期待されている。たとえば、低温での酵素処理と穏和な条件

での失活が望まれる食品加工用酵素や生化学・分子生物実験用酵素、冷水中での活性が求められる洗濯洗剤用酵素など、さまざまな分野で応用が期待されている。一方で、好冷性酵素は、安定性の低い構造であることから、製造、輸送、使用中に失活する場合があります。タンパク質工学的手法や進化工学的なアプローチによる構造安定性を保持した好冷性酵素の開発が求められている。

低温菌の低温環境適応を支えるタンパク質

近年、極地や深海、低温貯蔵中の変敗食品など多様な低温環境からさまざまな低温菌が採取され、次々に全ゲノム解析が進められている。全ゲノム情報を活用することで得られた微生物の環境適応機構に関する多くの知見が報告されており、低温誘導的に発現される遺伝子やタンパク質の解析から、低温菌において広く共通して見られる適応機構の存在が明らかとなってきた。南極由来の低温適応性アーキアの *Methanococcoides burtonii*、シベリア永久凍土より単離された *Exiguobacterium sibiricum* や *Psychrobacter cryohalolentis*、抗水サンプルより単離された低温菌 *Shewanella* sp. SIB1、南極海水由来の低温菌 *Pseudoalteromonas haloplanktis*、*Shewanella livingstonensis* Ac10 など、由来の異なる種々の低温菌のプロテオーム解析において、ペプチジルプロリル *cis-trans* イソメラーゼ (PPIase) 活性を有するタンパク質が低温誘導的に生産されていることが明らかとなった²⁻⁴⁾。一般に、タンパク質中のペプチド結合の大部分は *trans* 型であるが、プロリン残基の場合、N末端側のアミノ酸残基との間で *cis* 型ペプチド結合を形成する割合が、他のアミノ酸残基の場合に比べて著しく高い⁵⁾。ペプチド結合間の炭素-窒素結合は二重結合性が強く、*cis* 型への異性化は容易には起こらないが、PPIaseはプロリン残基のペプチド結合の異性化を触媒する (図1)。PPIaseによる *cis* 型ペプチド結合の形成はタンパク質の構造形成の律速段階であると考えられている。低温環境下ではタンパク質のフォールディング速度が低下するが、多くの低温菌はこのフォールディング速度の低下を克服するためにPPIaseを高生産していると推定される。*S. livingstonensis* Ac10においては、PPIase活性を有する trigger factor (TF) の生産量が低温誘導的に増加していた。

*著者紹介 京都大学化学研究所 (助教) E-mail: jun_k@mbc.kuicr.kyoto-u.ac.jp

特 集

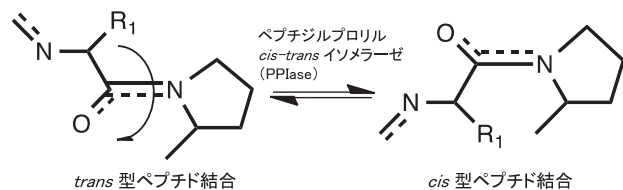


図1. ペプチジルプロリル *cis-trans* イソメラーゼ (PPIase) による *cis* 型ペプチド結合の形成

TFは、リボゾームに結合し新たに合成されるペプチド鎖と相互作用することで標的タンパク質のフォールディングを促進すると考えられる。TF以外に、本菌においてはRNAの生合成タンパク質 (RpoA) や二次構造形成を制御するRNAシャペロン (CspA)、タンパク質の合成とフォールディングに関与するTufB, Efp, LysU, PspA, DegP, Dpp4, SurA, 運動性に関与する鞭毛関連タンパク質FlgE, FlgL, AtoS, 細胞骨格タンパク質MreB, FtsZなどが低温誘導性タンパク質として見いだされた。また、2種のポーリントタンパク質 (OmpAおよびOmpC) が低温誘導的に生産されていた。これらは、可溶性分子の取込みを担うチャネルタンパク質として機能し、可溶性分子の拡散速度が低下する低温環境下で外膜の透過性を高め、効率的な栄養素の取込みに寄与していると考えられる。

Leuconostoc mesenteroides subsp. *mesenteroides* NH04 (以下, NH04株) は、近縁の*Leuconostoc*属標準株と比較して、10°Cでの生育能に優れた低温菌であり(図2)、低温貯蔵中の食肉加工品の変敗菌として単離された。このような低温で良好に生育する乳酸菌が食品中で繁殖すると、健康被害は生じないまでも、商品価値を大きく低下させ、変敗商品の回収や製造ラインの清掃に莫大なコストを要してしまう。これら食品に繁殖する低温増殖性微生物の低温適応機構を解明することは、食品変敗菌の早期検出や加工食品中での繁殖を抑制する手法の開発につながるものと期待される。

NH04株について10°Cで誘導生産されるタンパク質を2次元電気泳動、およびN末端アミノ酸配列の解析により同定した。その結果、NH04株は抗酸化酵素の一種であるペルオキシレドキシシン (alkyl hydroperoxide reductase, AhpC) の相同性タンパク質を低温誘導的に生産していることがわかった。AhpCの生産は転写レベルで制御されており、他の*Leuconostoc*属標準株と比較して、10°Cでの生産レベルは有意に高いことがわかった。生体内では、エネルギー代謝に伴って細胞内に過酸化水素が生じる。活性酸素種の一種である過酸化水素は、細胞膜脂質やDNAを酸化・損傷することから迅速に除

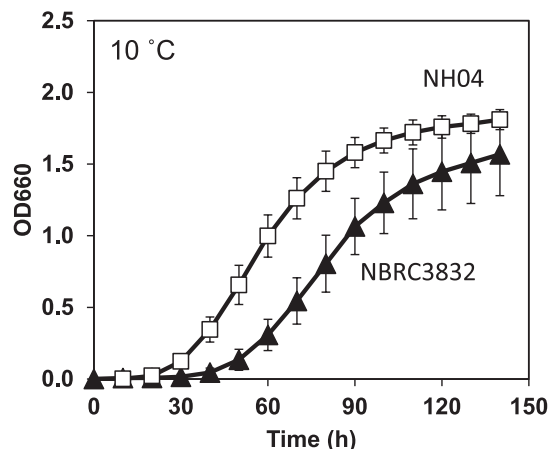
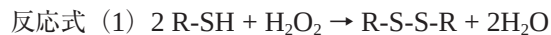


図2. 食品変敗性乳酸菌と標準株の低温での増殖能

去される必要がある。AhpCは、細菌から高等生物まで生物界に広く保存されているタンパク質であり、AhpCは分子内の2つのシステイン残基を用いて、以下の反応を触媒することで、細胞内の活性酸素種を除去している。



(上式において、Rはタンパク質の主鎖を意味する)

NH04株は抗酸化酵素であるAhpCを低温で高生産していたことから、本菌の抗酸化能が低温での生育に関与していることが示唆された⁷⁾。NH04由来の*ahpC*を近縁の標準株 (NBRC3832株) に導入したとき、NBRC3832株の10°Cでの生育速度が上昇することがわかった。低温では呼吸やさまざまな代謝反応において電子伝達を伴う化学反応速度が低下する。電子伝達が円滑に進行しないとき、電子伝達タンパク質や、その複合体から漏出した電子は活性酸素種の過剰産生の原因となることが予想される。NH04株は電子伝達を伴う化学反応速度が低下することで活性酸素種が生成されやすい低温環境で、細胞内の活性酸素種を低レベルに維持するために、AhpCなどの抗酸化酵素を高生産していることが示唆された。今後、低温での抗酸化酵素の生産性を指標とした食品変敗性乳酸菌の早期検出法の開発や、抗酸化能を阻害することで低温貯蔵中の繁殖を抑制する手法の開発が期待される。

低温菌の細胞膜

細胞膜は細胞内外を区別する境界として機能する以外に、呼吸やエネルギー生産、物質輸送を担う重要な器官である。細胞膜は主に、親水性の極性頭部と疎水性のアシル鎖で構成されるリン脂質と疎水性の膜タンパク質に

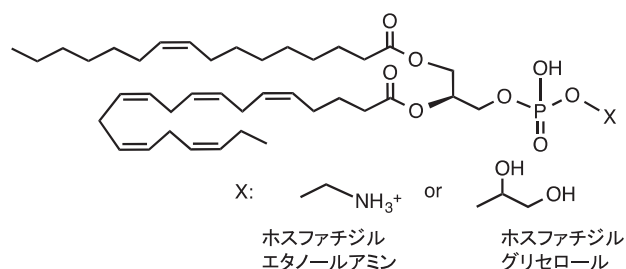


図3. エイコサペンタエン酸含有リン脂質の構造

よって形成される。微生物は生育環境に応じて細胞膜脂質組成を変化させることが知られており、低温環境において不飽和化酵素を誘導生産し、アシル鎖の特定の位置に二重結合を導入することで、融点を下げ、膜全体の流動性を維持している場合がある。一方で、深海などの海洋環境には、これらとは異なる仕組みで低温環境に適した生体膜を形成している低温菌群が存在する。

海洋環境由来の低温菌の多くは、エイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) といった長鎖多価不飽和脂肪酸を生合成する。EPA や DHA は生体膜リン脂質 (ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール) のアシル鎖として存在し (図3)、直鎖飽和脂肪酸や、二重結合を一つ持つモノ不飽和脂肪酸に比べて、生体膜の膜厚や弾性、透過性や流動性といった物理化学的特性を顕著に変化させることで近傍の膜タンパク質の機能発現に影響すると考えられている。*Shewanella* 属細菌や *Photobacterium* 属細菌、*Moritella* 属細菌、*Colwellia* 属細菌といった海洋性低温菌には、EPA や DHA の生合成酵素群をコードする遺伝子クラスターが高度に保存されており、他の脂肪酸とは独立した生合成経路を経て EPA や DHA が生合成されている。高等生物において長鎖多価不飽和脂肪酸はシグナル伝達物質の前駆体として重要であり、人においては抗炎症作用、抗腫瘍作用を有する生理活性脂質として知られているが、細菌の低温環境適応機構における詳細な生理的役割は不明な点が多い。

南極海水由来の低温菌 *S. livingstonensis* Ac10 は低温誘導的に全脂肪酸の 5% 程度まで EPA を生産する。本菌の EPA 生合成遺伝子を破壊することで獲得した EPA 欠損株 (Δ EPA) は、本菌の至適生育温度である 18°C では野生株と同様に生育するが、4°C では顕著に生育速度が低下することがわかった。培地に EPA を添加することで低温での生育速度の低下が抑制されたことから、本菌の低温環境適応において EPA が重要な機能を担うことが示された。従来、低温菌における EPA や DHA 含有

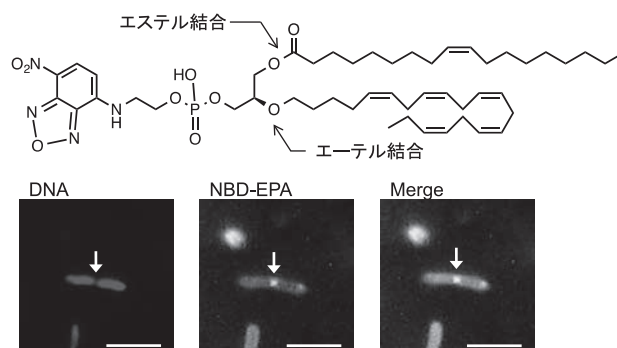


図4. NBD 標識した EPA アナログ含有リン脂質プローブの構造 (上段) と細胞内局在 (下段). 矢印は核様体閉鎖領域を示す。

リン脂質の生産は膜の流動性の維持に関与していると予想されていた。本菌の生体膜をもちいて、疎水性蛍光分子ピレンの側方拡散速度を指標に膜流動性を解析したとき、本菌の生体膜は大腸菌に比べて流動性が高いことが示された。また、EPA の欠損が本菌の膜全体の流動性には影響しないことがわかった⁸⁾。近縁の *S. maritima* IK-1 において、EPA の欠損は過酸化水素感受性を上昇させたことから、EPA は活性酸素種の膜透過性を軽減させることが報告されているが⁹⁾、本菌の EPA の欠損は過酸化水素感受性には影響しなかった。以上の結果は、本菌の EPA は従来知られていなかった生理機能を担うことを示唆している。*S. livingstonensis* Ac10 の Δ EPA を詳細に解析した結果、 Δ EPA は低温で顕著に伸長した細胞を形成し、野生株には存在しない異常な細胞内膜構造が発達していた。その他に特定の外膜タンパク質の生産量が顕著に低下していたことから、EPA 含有リン脂質は細胞分裂や膜タンパク質の輸送に関連するタンパク質の低温での機能発現に関与していることが予想された。リン脂質の極性頭部に蛍光発色団 NBD を付加し、エーテル結合を介してエイコサペンタエニル基 (20:5) をリン脂質のグリセロール骨格の *sn*-2 位に導入した蛍光リン脂質アナログを合成し、本菌に添加した結果、核様体閉鎖領域に濃縮した蛍光シグナルが検出された (図4)。エイコサペンタエニル基の対照に、オレイル基 (18:1) を導入した蛍光リン脂質を用いた場合、局在化した蛍光シグナルは検出されなかったことから、本菌は細胞分裂サイトに EPA 含有リン脂質が濃縮したマイクロドメイン構造を形成していると考えられた¹⁰⁾。還元剤を用いた NBD の消光実験の結果から、細胞内膜の内葉に到達した EPA 含有リン脂質が細胞分裂サイトに濃縮されることが示唆された。上述のように本菌の低温での細胞分裂では、EPA が重要な機能を有していることから、EPA

特 集

含有マイクロドメインの存在は、本菌の細胞分裂装置とEPAとの相互作用の存在を強く示唆している。EPA含有マイクロドメインの形成メカニズムの詳細は明らかでないが、EPA含有リン脂質が曲率の高い細胞分裂部位に濃縮する可能性や、EPA含有リン脂質が特定のタンパク質と相互作用することで細胞分裂部位に濃縮する可能性が考えられる。さらに、本菌のリン脂質生合成経路において、sn-2位へのEPAの導入反応は、本菌ゲノムより見いだされた5つの1-アシルグリセリン酸アシル転移酵素 (PlsC1~5) のうち、PlsC1が触媒することがわかっている¹¹⁾。大腸菌の場合、1つのPlsCが多様なアシル鎖を有するリン脂質の生合成に関与していることが知られているが、*S. livingstonensis* Ac10の場合は基質特異性の異なる複数のPlsCが多様なリン脂質の生合成に関与しているものと考えられる。細胞分裂部位におけるEPA含有マイクロドメインの形成においては、PlsC1もしくはEPA生合成酵素が細胞分裂装置と相互作用することが関与している可能性が考えられる。

EPA含有リン脂質が膜タンパク質の構造形成におよぼす影響を解析するために、本菌が低温誘導的に生産する外膜ポーリンタンパク質OmpAホモログ (Omp74) をモデルタンパク質とした*in vitro*再構築実験を行った。Omp74の非加熱SDS-PAGEにおける移動度の変化を指標に、リボソーム存在下でOmp74のリフォールディング速度を解析した結果、EPA含有リン脂質を5 mol%添加したリボソーム存在下で、EPA含有リン脂質を含まないリボソームに比べて速やかにOmp74のリフォールディングが進行することがわかった。Omp74は大腸菌のOmpAと同様にβ-バレル型のチャネルドメインを形成することから、EPA含有リボソーム存在下での2次構造形成を円偏光二色性スペクトル解析により経時的に解析した結果、EPA含有リン脂質はOmp74のβ-シート形成と高次構造の形成を促進することがあきらかとなった¹²⁾。これらの結果は、EPA含有リン脂質がOmp74の高次構造形成を促進するシャペロン様機能を有することを示している。計算機科学的手法による脂肪酸の炭化水素鎖の構造多様性の解析により、DHAやEPAといった非共役二重結合が多く存在する長鎖多価不飽和脂肪酸は、モノ不飽和脂肪酸に比べて少ないエネルギー障壁で多様なコンフォメーションをとることが可能であり、タンパク質表面の凹凸に容易にフィットすると考えられている¹³⁾。その結果、長鎖多価不飽和脂肪酸は膜タンパク質の疎水的領域への溶媒和を向上させる機能があると予想されている。Omp74の*in vitro*リフォールディングに

において、EPA含有リン脂質はOmp74の溶媒和を向上させることで、膜への挿入や膜内での構造変化を促進させたものと考えられる。*S. livingstonensis* Ac10は上述のように細胞分裂が進行する核様体閉鎖領域において、EPA含有リン脂質が濃縮したマイクロドメインを形成することが示唆されている。細菌においては少なくとも12種の細胞分裂関連タンパク質が核様体閉鎖領域に会合し、協調して機能することで正常に細胞分裂が進行するが、EPA含有マイクロドメインはタンパク質の構造変化が容易に起こるシャペロン様機能を有する領域として細胞分裂に伴うタンパク質の構造変化に寄与している可能性が考えられる。

まとめ

低温菌は低温環境が広がる地球上で広大な生存可能域を獲得する過程で、多様な進化を果たしたと考えられる。低温での高い触媒活性を得るために構造上不安定な酵素を生産するが、このような好冷性酵素は産業用酵素としての応用の可能性も注目されており、現在もさまざまな低温環境から低温活性を有する有用酵素のスクリーニングが進められている。海洋性低温菌が生産するEPA含有リン脂質について認められたシャペロン様機能は、種々の膜タンパク質の効率的な生産系構築に寄与する可能性が期待される。一方、食品変敗能を有する低温菌の環境適応の分子基盤の解明と、それに基づく検出法と増殖抑制法の開発は、持続的で豊かな食生活の発展・維持に寄与するものと考えられる。今後も、低温菌の環境適応メカニズムの研究から、微生物機能の新たな一面がわかされるとともに、産業上有用なさまざまな技術シーズが得られるものと期待される。

文 献

- 1) Cavicchioli, R. *et al.*: *Microb. Biotechnol.*, **4**, 449 (2011).
- 2) Feller, G.: *Scientifica (Cairo)*, 512840 (2013).
- 3) Suzuki, Y. *et al.*: *Eur. J. Biochem.*, **271**, 1372 (2004).
- 4) Kawamoto, J. *et al.*: *Extremophiles*, **11**, 819 (2007).
- 5) Wedemeyer, W. J. *et al.*: *Biochemistry*, **41**, 14637 (2002).
- 6) Jabs, A. *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **286**, 291 (1999).
- 7) Goto, S. *et al.*: *AMB Express*, **5**, 11 (2015).
- 8) Kawamoto, J. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **191**, 632 (2009).
- 9) Nishida, T. *et al.*: *FEBS Lett.*, **581**, 4212 (2007).
- 10) Sato, S. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **287**, 24113 (2012).
- 11) Cho, H-N. *et al.*: *Trace Nutrients Res.*, **29**, 92 (2012).
- 12) Dai, XZ. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **425**, 363 (2012).
- 13) Feller, S. E. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 318 (2002).