



東京工業大学生命理工学院 八波 利恵

極限環境微生物が生産する極限酵素の機能解明とその応用

はじめに

極限環境微生物 (Extremophile) とは、高温・低温、高 pH・低 pH、高塩、高圧など、通常の微生物が生育できそうにない極限環境に生育する微生物である。これらの極限環境微生物が生産する酵素は、極限酵素 (Extremozyme) とよばれ、極限環境においても機能するものが多い。そのため、極限酵素の応用に着目した研究が広く行われてきた。私たちは、これまで高度好塩性古細菌、好アルカリ性細菌、好熱菌といった極限環境微生物が生産する極限酵素 [耐塩性酵素、耐アルカリ性酵素、耐熱性酵素] の機能解析を行ってきた。また、それぞれの極限酵素がもつ極限耐性因子を組み合わせ、複数の極限耐性を有する "Poly-extremozyme" の取得にも成功している。さらに近年は、高度好塩性古細菌が生産する有用物質の同定・生合成経路の解明と高度好塩性古細菌を用いた代謝工学および進化分子工学を用いた機能性物質生産の研究も進めている。以下はこれまでの研究のうち、高度好塩性古細菌に関する研究を中心に紹介する。

1. 高度好塩性古細菌 *Haloarcula japonica* におけるカロテノイドの同定および生合成経路の解明

高度好塩性古細菌とは、生育に 2.5 M 以上の塩化ナトリウム (NaCl) を要求する極限環境微生物である。ある種の高度好塩性古細菌は、カロテノイドの一種であるバクテリオルベリン (BR, 図1) を生産することが知られている。BR の共役二重結合数は 13 であり、現在産業界において広く利用されているアスタキサンチンと同じである。そのため、高い抗酸化活性を有していると考えられている。

Haloarcula japonica は、石川県塩田土壌より分離された高度好塩性古細菌であり、三角形平板状という特徴的な形態を有している (図2)^{1, 2)}。2011 年には全ゲノム配列解析が終了し、

本菌は 2 つの環状染色体と 3 つの環状プラスミドを有することが明らかとなった³⁾。本菌のコロニーは赤色を呈しており、カロテノイドを生産していると推察された。しかしながら、その生合成経路は未解明であった。

そこで、*Ha. japonica* におけるカロテノイド生合成経路の同定を目的として、まず本菌の生産するカロテノイドを同定した。その結果、*Ha. japonica* は類縁菌 *Hb. salinarum* と同様、フィトエン、リコペン、イソペンテニルデヒドロロドピン (IDR)、ビスアンヒドロバクテリオルベリン (BABR)、モノアンヒドロバクテリオルベリン (MABR) および BR を生産していることがわかった⁴⁾。ある種の細菌のカロテノイド生合成経路において、フィトエンからリコペンに至る反応ではフィトエンデサチュラーゼ (CrtI) の関与が知られている。そこで、本菌ゲノム上より *crtI* ホモログの有無を調べた結果、4 つの遺伝子が見いだされた。このうち、既知の *crtI* と相同性のより高い 2 つの遺伝子ホモログ (*c0507* および *d1086*) の機能を明らかにするため、これらの遺伝子の単独破壊株および二重破壊株を構築し、生産するカロテノイド種の解析を行った。その結果、*Ha. japonica* のフィトエンからリコペンに至る反応においては、*c0507* および *d1086* にコードされる 2 つの *crtI* が関与する生合成経路が存在することが明らかとなった (図1)。また、*c0507* 近傍のゲノム配列を詳細に調べたところ、*c0507* のすぐ下流に存在する *c0506* および *c0505* が、それぞれリコペンエロンガーゼおよびヒドラターゼの遺伝子ホモログであることがわかった。これら 3 つの遺伝子はクラスターを形成し、共転写されていたことから、本菌のカロテノイド生合成に密接に関与していると予測された。そこで、*c0507/c0506/c0505* 遺伝子クラスターを構成するそれぞれの遺伝子の単独破壊株を構築し、それらの生産するカロテノイド種の分析を行った。その結果、*C506* はイソプレレンおよび水酸基を付加する二機能酵素

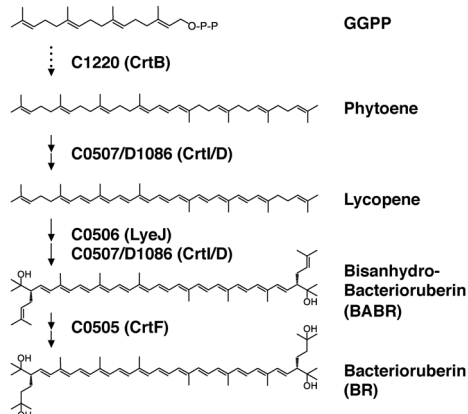


図1. *Ha. japonica* におけるカロテノイド生合成経路。点線は推定される経路を示す

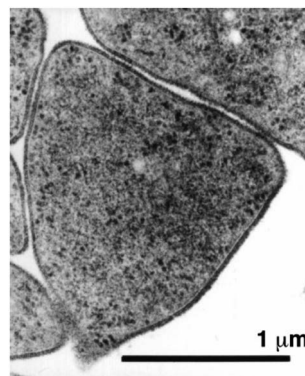


図2. 高度好塩性古細菌 *Haloarcula japonica* の電子顕微鏡写真。バーは 1 μm を表す

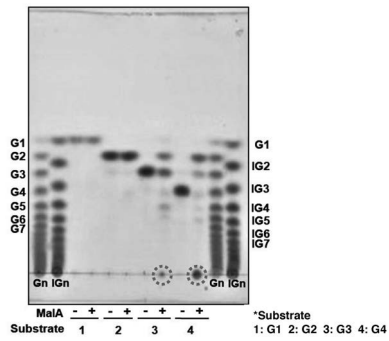


図3. マルトオリゴ糖を基質とした組換え MalA による加水分解および糖転移反応産物の TLC 解析
MalA に基質を加え、2.0 M KCl 存在下、37°C で 24 時間反応後の産物を TLC に供した。高重合度グルカンを破線の丸で囲った。

(リコペンエロンガーゼおよび 1,2-ヒドラーゼの両方の活性をもつ酵素)、C507 は、リコペンから BR の生合成において 3,4-デサチュラーゼ (CrtD)、そして C505 はヒドラーゼ (CrtF) として機能することがわかった (図2)⁵⁾。C506 は、すでに *Hb. salinarum* より同定されている Lye と相同性を有することから、LyeJ と名付けた。また C507 は上述したとおり、フィトエンデサチュラーゼ活性も有することから CrtI/D とよべる。以上より、*c0507/c0506/c0505* 遺伝子クラスターにコードされる 3 つの酵素がリコペンから BR の生合成に関与することが明らかとなり、高度好塩性古細菌におけるリコペンから BR の生合成経路が初めて同定された。

2. 高度好塩性古細菌 *Ha. japonica* 由来新規枝作り酵素 MalA の解析

Ha. japonica の全ゲノム配列解析の結果、本ゲノム上には、デンプン関連酵素 MalA が存在することがわかった。高度好塩性古細菌に由来するデンプン関連酵素の報告例は少なく、新規な酵素の可能性が考えられた。そこで、組換え MalA を取得し、その性質を明らかにすることとした。その結果、本酵素はアミラーゼとアノテーションされていたものの、オリゴ糖を基質として高重合度グルカンを合成する新規な枝作り酵素であることが明らかとなった (図3)⁶⁾。さらに MalA に G3 (グルコースが α -1,4 結合で 3 つ連なったマルトトリオース、以下同様) を作用させて合成した高重合度グルカンの構造を調べたところ、このグルカンは G1 を含む非常に短い分岐鎖を数多く有し、主な分岐鎖は G2-G5 であることが明らかとなった。また、非還元末端にはイソマルトシル構造を有し、内側には α -1,4 グルコシド結合が存在することがわかった。すなわち、MalA はグルコース単位で α -1,6 グルコシド結合を形成する新規な性質を有することが示唆された。一方、*malA* 周辺のゲノム配列を詳細に調べたところ、*malA* 下流には各種糖質関連酵素をコードする遺伝子が連なってみいだされ、その一部が大腸菌のグリコーゲン生合成系遺伝子群と相同性を示した。これより、本菌はグリコーゲン様高重合度グルカンを合成し、その合成は、*malA* を含む糖質関連酵素遺伝子群が関与していると考えられた。

おわりに

本稿では、高度好塩性古細菌 *Haloarcula japonica* によるカロテノイド合成および MalA による高重合度グルカン合成を紹介した。高度好塩性古細菌は、培養に高濃度の塩を必要とするため、コンタミネーションのリスクが極めて低い。そのため、有用物質生産に用いた場合、生産の場として地球上の高塩環境 (塩害土壌、塩田および塩湖など) を利用することが可能である。すなわち、高度好塩性古細菌による物質生産は、滅菌したりリアクターを必要としないため、高温高压滅菌に伴う膨大な熱エネルギーの消費と CO₂ 排出を削減することができる。従って、SDGs に貢献するとともに、貴重な水を膨大に使用してきたこれまでの発酵産業を大きく変換・転換する生産系の一つといえよう。今後は、高度好塩性古細菌を用いて耐塩性酵素による種々の有用物質生産を行うとともに、例えば、耐塩性と耐熱性を併せもつ “Poly-extremozyme” を作製し、それらを用いた多様な物質生産を進めていきたい。

(引用文献)

- Horikoshi K, Aono R, Nakamura S. The triangular Halophilic archaeobacterium *Haloarcula japonica* strain TR-1. *Experientia*, 49, 497-502 (1993).
- Nishiyama Y, Takashina T, Grant W D, Horikoshi K. Ultrastructure of the cell wall of the triangular halophilic archaeobacterium *Haloarcula japonica* strain TR-1. *FEMS Microbiol. Lett.*, 99, 43-47 (1992).
- Nakamura S, Nakasone K, Takashina T. *Extremophiles Handbook* (Horikoshi K, Antranikian G, Bull A T, Robb F T, Stetter K O, eds.), Springer, pp. 364-381 (2011).
- Yatsunami R, Ando A, Yang Y, Takaichi S, Kohno M, Matsu-mura Y, Ikeda H, Fukui T, Nakasone K, Fujita N, Sekine M, Takashina T, Nakamura S. Identification of carotenoids from the extremely halophilic archaeon *Haloarcula japonica*. *Front. Microbiol.*, 5, 100-105. (2014).
- Yang Y, Yatsunami R, Ando A, Miyoko N, Fukui T, Takaichi S, Nakamura S. Complete biosynthetic pathway of the C₅₀ carotenoid bacterioruberin from lycopene in the extremely halophilic archaeon *Haloarcula japonica*. *J. Bacteriol.*, 197, 1614-1623. (2015).
- Onodera M, Yatsunami R, Tsukimura W, Fukui T, Nakasone K, Takashina T, Nakamura S. Gene analysis, expression and characterization of an intracellular α -amylase from extremely halophilic archaeon *Haloarcula japonica*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77, 281-288 (2013).

謝辞 本研究を遂行するにあたり、学生の頃から今日に至るまで多大なるご指導とご助言を賜りました東京工業大学名誉教授 中村 聡先生に深く感謝申し上げます。また、カロテノイドの分析手法をご教示いただきました東京農業大学教授 高市真一先生に心よりお礼申し上げます。さらに、高重合度グルカンの解析にあたり、秋田県立大学教授 鈴木英治先生および同助教 鈴木龍一郎先生から貴重な御助言、ご協力をいただきました。心より感謝申し上げます。そして、これまで多方面に渡りご指導いただいた諸先生方、ならびに当研究室と一緒に研究を行ってきた在学学生、卒業生に厚く御礼申し上げます。最後に、本賞にご推薦くださいました東京工業大学教授 和地正明先生をはじめ、選考委員の先生方、ならびに関係する先生方に深く感謝いたします。