

工学研究科 物質・生命工学専攻 極限生命工学講座



金谷 茂 則*

Biological Extremity Engineering Laboratory,
Dept. of Material and Life Science,
Graduate School of Engineering

Key Words : Oil bacteria, Hyperthermophilic archaeon, Psychrophiles, Protein, Ribonuclease H

1. はじめに

大阪大学大学院工学研究科の重点化は今年完了したが、物質・生命工学専攻は、応用自然科学系大学院専任専攻として、4年計画ですすめられてきた本重点化の初年度平成7年4月に発足した。物質・生命工学専攻の目標は、物理学、化学が主体となり発展してきた物質工学と、生物学、情報科学に基礎を置く生命工学とが融合した新しい学問領域を確立し、その最先端の工学的発展を図るとともに、従来の学問領域や研究領域を超越した新しい科学観をもつ次世代の研究者・技術者を養成するための教育と研究を行うというものである。本専攻は8講座から構成されている。多くの大学組織が従来の小講座制から大講座制に移行しつつあるなかで本専攻が小講座制を存続させたのは、教育・研究分野の著しく異なる教官や学生が無秩序に組織を構成することによりもたらされるであろう混乱を避けるためである。なお、本専攻設置の理念や意義あるいは経緯については、大阪大学工業会誌¹⁾あるいは本誌²⁾に梅野、横山両教授による

解説が掲載されているのでそれらを参照して読みたい。

極限生命工学講座は平成7年4月に大学院重点化に伴い新設された。講座の名称は、極限生物と生命工学を融合させて作ったものである。極限生物とは、人間を含め地球上の通常の生物には生育することのできない極限環境でも生育することのできる生物(微生物)のことで、好熱菌、好冷菌、好塩菌、好酸性細菌、好アルカリ性細菌などがよく知られている。好熱菌の中には100℃以上の高温でも生育できるものがある。好冷菌の中には氷点下でも生育できるものがある。好塩菌の中には2M以上の高濃度の食塩存在下でも成育できるものがある。好酸性細菌や好アルカリ性細菌の中にはpH2以下あるいはpH10以上でも生育できるものがある。さらには地球の地下深くに生育している微生物、海底火山の噴火口附近に生育している微生物、油田に生育する微生物など極限生物の種類を数え上げればきりが無い。極限生物はいずれも地球上の極限環境下で細々と生育していると思われるが、通常の生物がとうてい生育できそうもない苛酷な条件下で生命機能を維持していることは深い驚きである。このような条件下では生物の特定の機能が顕在化するので、極限生物を研究することにより、生命の本質を理解する上でも産業上有用な物質生産技術を開発する上でも有用な知見が得られると期待される。一方、生命工学は生物が持っている機能を応用する技術のことで、バイオテクノロジーという方がわか

* Shigenori KANAYA
1950年1月22日生
1973年(昭和48年)東北大学・
理学部・化学第二学科卒業
現在、大阪大学大学院工学研究科、
物質・生命工学専攻、極限生命工
学講座、教授、理学博士、蛋白質工
学
TEL 06-879-7938
FAX 06-879-7938
E-Mail kanaya@chem.eng.
osaka-u.ac.jp



りやすい。バイオテクノロジーは単一の技術ではなく、遺伝子組み換え、細胞融合、微生物醗酵、体外受精などいくつか異なる技術の集合体である。しかし、基本となる技術は、遺伝子の本体であるDNAを操作する遺伝子組み換え技術で、この技術の発展がトランスジェニック動物やクローン動物の創出まで可能にしたことは衆知のとおりである。

極限生命工学講座では、主として遺伝子工学や蛋白工学の技術を用いて、極限微生物あるいは関連微生物から蛋白質などの生体機能物質をとりだし産業利用することをめざしている。また、これらの微生物自身あるいは蛋白質などの生体機能物質の産業上有用な性質を増強する技術、さらにはそのような性質を人工的に賦与する技術の開発をめざしている。研究の対象は微生物であるが、目標とする応用分野は、環境保全分野、医療分野、化学工業分野など多岐にわたっている。現在の講座の構成員は、平成10年7月の時点で私に加え、森川正章助教授、春木満助手、松本玲子事務補佐員、天田啓博士研究員、博士後期課程1年4名、前期課程2年4名、1年5名、4年6名、ベトナムからのユネスコ学生1名である。

2. 研究の概要

4年生も含めてそれぞれ独自のテーマのもとに研究をすすめているので、研究テーマは比較的多岐にわたっている。しかし、これらは1)油田細菌によるCO₂固定と石油分解に関する研究、2)超好熱菌・好冷菌由来蛋白質の研究、3)リボヌクレアーゼHの蛋白工学的研究、に大別される。

1) 油田細菌によるCO₂固定と石油分解に関する研究

昨年の地球温暖化防止京都会議で、世界各国のCO₂排出削減目標を定める京都議定書がまとめられた。それによると、日本は2008年から2012年までの間CO₂排出量を現在より6%削減しなければならない。しかし、最近の環境庁の調査では日本のCO₂排出量は毎年5%ほど増え続けている。従って、日本ではCO₂削減技術の開発が急務になっている。本講座では、

微生物の中にCO₂固定能力を持つものがあることに着目し、微生物を用いたCO₂固定技術の開発を目的として、そのような微生物の単離やCO₂固定能力の増強などに関する研究を行っている。特に、静岡県の油田から分離された石油代謝細菌HD-1株は、CO₂とH₂から石油主成分を合成するだけでなく、嫌氣的条件下で石油を分解するという興味深い性質を示すので(図1)、本菌のCO₂固定化経路及び石油代謝経路の解明と遺伝子組み換え技術によるその能力の強化を目標に研究を行っている。

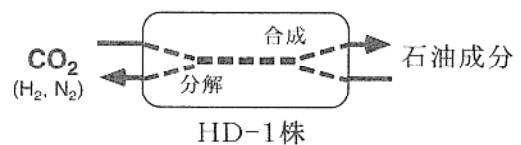


図 1

また、秋田、山形、新潟の高温油田、マレーシアの海底油田、カナダの内陸油田、あるいは各地の原油備蓄タンクなどからの新規微生物のスクリーニングも行っている。これまでのところCO₂固定能力においてHD-1株を上回る微生物は単離されていないが、CO₂固定能を持ち、増殖速度や石油分解能においてははるかにHD-1株をしのぐ新属細菌TK-122株が得られている。さらに、CO₂固定や石油分解との関連は未定であるが、最適生育温度が70℃付近にある好熱性細菌も何種類か得られている。現在、これらの菌の固定をすすめている。

一方、別の細菌MIS38株の生産するリポペプチド型バイオサーファクタント(アルスロファクチンと命名)が極めて強力な界面活性を示すことを発見したので、その活性発現機構の解明も目指している。バイオサーファクタントは、原油などを微生物により分解されやすいように乳化するので、タンカーから漏出した重油による海洋汚染除去などに役立つと考えられている。また、農作物病害菌に対する抗菌活性も示すため、バイオサーファクタントは農薬や土壌活性剤としても利用できる。

このように、油田細菌を利用することにより、CO₂を固定するだけでなく石油などの燃料資源あるいは農薬・土壌活性剤などの高付加価値物

質として再資源化するシステムを構築することが可能になるので、本研究は、将来的には地球環境の修復に貢献するものと期待される。なお、本研究は「CO₂固定細菌を利用した地球環境修復システムの構築」という課題名(研究代表者: 森川正章)で生物系特定産業技術研究推進機構の基礎研究推進事業の研究課題として採択されており、平成8年度から5年間の予定で受託研究を行っている。

2) 超好熱菌・好冷菌由来蛋白質の研究

微生物は、その最適生育温度の違いにより好冷菌、中温菌、超好熱菌などに分類される(図2)。

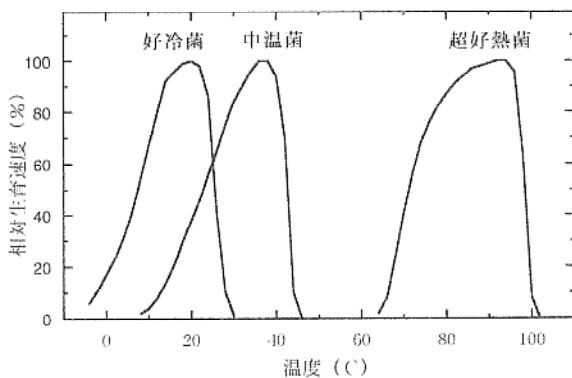


図2 生育の温度依存性

中温菌と超好熱菌の間には中等度好熱菌や高度好熱菌も存在する。これら最適生育温度の異なる菌の生産する生体高分子(蛋白質など)の機能はそれぞれ異なる温度依存性をしめす。例えば、一般に超好熱菌由来酵素は中温菌由来酵素より高い耐熱性を示す。一方、好冷菌由来酵素は中温菌由来酵素より低温で高い活性を示す。ところで、耐熱性の異なる酵素の活性を、これらの酵素が熱変性しないようなある一定の温度で測定した場合、一般に耐熱性の高い酵素ほど低い活性を示すことが知られている。これは、温度が一定の場合酵素の安定性が増すほど酵素の柔軟性が損なわれるためと考えられている。しかし、部位特異的変異法を用いたこれまでの研究から、酵素の活性と安定性は必ずしも反比例するとは限らず、酵素の一部を改変するだけでその活性あるいは安定性だけを改変できることがわかってきた。しかし、そのような設計技術を確立するためには、酵素の活性や安定性の向上

に寄与する様々な因子を同定・抽出してその機構を明らかにすることが必要と考えられる。この目的のためには、機能的構造的に類似しているにもかかわらず活性の至適温度や耐熱性が大きく異なる2種類の酵素を選び、これらの性質の違いをもたらす因子を同定・抽出する方法が有効と考えられる。このような観点から、本講座では、セリンプロテアーゼ、グリセロールキナーゼ、RNase HIIIなどの遺伝子を超好熱菌 *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1 からクローニングし、これらの酵素の特質を解析している。また、これらの遺伝子の好冷菌からのクローニングも試みている。

なお、超好熱菌 *P. kodakaraensis* KOD1 は始原菌(archaea)の一種である。進化系統的解析によると、始原菌は細菌(bacteria)や真核生物(eukaryote)とは異なるグループに分類されるが、どちらかというとも真核生物と近縁である。従って、進化的には始原菌と真核生物の共通の祖先がまず細菌から分かれ、ついで始原菌と真核生物が互いに分かれたと考えられる。一方、始原菌の成育環境は原始地球環境に類似していると考えられるので、本菌は、地球上に最初に誕生した原始生命体の名残りを少なくとも細菌や真核生物よりは多く留めていると考えられている。このように、始原菌、特に超好熱始原菌は原始生命体と真核生物の両方の性質を合わせ持つことが期待されるので、生命の進化をたどる上でも貴重な生物資源である。本講座では、このように生命の進化を探る手がかりをつかむことも目標の一つとして超好熱菌の研究を行っている。この結果、グリセロールキナーゼが4量体ではなく2量体として働くこと、各種酵素の基質特異性や金属イオン要求性がそれほど厳密ではないことなど、超好熱菌由来蛋白質に特徴的とみられる性質をいくつか見いだしている。また、TBPに結合する蛋白質が真核生物にしか存在しないとされている zinc finger motif を持つことや、この蛋白質が転写抑制因子として働краしいことなどを見いだしている。

3) リボヌクレアーゼH(RNase H)の蛋白質工学的研究

生体の主要な構成成分である蛋白質は、アミ

ノ酸のつながった1本のポリペプチド鎖がおりたたまれ高次構造を形成した時にはじめてその機能を発揮する。機能上または構造上類似している蛋白質同士は一般にファミリーと呼ばれるが、自然界に存在するファミリーの種類は1000ぐらいと言われている。リボヌクレアーゼH (RNase H)はこうしたファミリーの一つである。RNase HはRNA/DNAハイブリッド鎖のRNA鎖を特異的に加水分解する酵素で、DNA複製に必要なRNAプライマーを合成・除去したり、DNAに間違っているとこまれたRNAを除去したりすると考えられている。その三次構造はRNase H-foldとよばれ、リン酸基転移酵素の基本構造単位として生物界に普遍的に存在することが示唆されている(図3)。

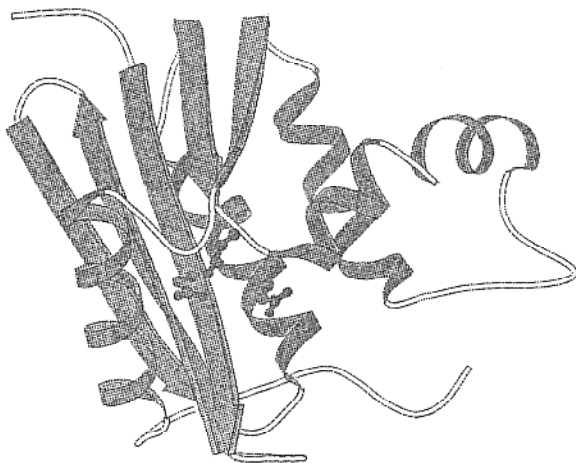


図3 大腸菌RNase HIの三次構造

各種RNase Hはもちろんのこと、リゾルベースやインテグラーゼなど、RNase Hとは一次構造的にも機能的にも異なる酵素が三次構造的にはRNase H-foldを持つことが既に明らかにされている。ところで、生物の持つ機能の応用を図るためには、その機能をまず理解することが必要である。生物の機能は基本的には蛋白質の働きによって調節されているので、生物の機能を理解するためには蛋白質の働きを理解することが必要になる。しかし、これまでに数多くの蛋白質が単離されその機能や構造が詳細に解析されているにもかかわらず、蛋白質がどのような機構で固有の三次構造を形成するのか、そしてどのような機構で機能を示すのかについ

てはまだあまりよく理解されていない。RNase Hの場合も同様である。本講座では、蛋白質の構造や機能に対する理解を深め、蛋白質機能の改変技術を確立するために、RNase Hを研究対象として、基礎と応用両方を視野にいれながら研究をすすめている。

(3-1) RNase Hの分子進化

ヒトをはじめ様々な生物の全遺伝子配列が決定されつつあり(ゲノムプロジェクト)、すでに10種類以上の生物の全遺伝子配列が決定されている。これらの配列情報はデータベース化されているので、誰でも目的遺伝子をその配列の相同性から検索することができる。このようにしてRNase Hの遺伝子を検索することにより、自然界には互いに異なる配列を持つRNase Hが少なくとも3種類存在する事がわかってきた。これらはRNases HI, HII, HIIIとして分類される。また、始原菌(archaea)はRNase HIIIを1種類しか持たないのに対し、細菌(bacteria)や真核生物(eukaryote)は2種類のRNase Hを持つことがわかってきた。さらに、RNase HIは細菌にも真核生物にも存在するが、必ずしもすべての細菌や真核生物に存在するわけではないこともわかってきた。始原菌は進化的に細菌よりも真核生物に類似していると考えられているので、RNase Hの祖先はRNase HIIIであり、RNase HIはRNase HIIIから進化した後、レトロウィルス感染などにより細菌から真核生物へ、あるいは逆に真核生物から細菌へと伝えられたものと考えられる。現在、これらの仮説を裏付けるデータを得るために、様々な生物からRNase Hの遺伝子をクローニングしこれらの酵素の構造や機能を解析している。

(3-2) RNase Hの応用研究

RNase Hは、cDNAを合成するために必要な酵素の一つとして広く利用されている。RNase HはmRNAからcDNAを作る過程で不要になったmRNAを効率よく分解・除去するからである。他にも、本酵素はmRNAからのpolyA-tailの除去、RNAのエディティングなどに利用されている。本講座では、RNase Hの新しい利用法の開発をめざして研究をすすめている。

一つは、サイクリング・プローブ法(CPT法)に適した酵素の開発である。CPT法は、結核菌などの病原性細菌による感染の検査法として、その遺伝子を高感度で迅速に検出する方法の一つとして開発されている。本法の特徴は、両端がDNAで中央部がRNAから構成されているDNA-RNA-DNAをプローブとして用いることである。つまり、このプローブは標的DNAに結合した時だけ中央部のRNAのところまでRNase Hにより切断され、短くなったプローブ断片が蓄積するので、このプローブ断片を検出することにより目的の配列を持つ遺伝子の有無を検出することができる。現在、大腸菌や好熱菌のRNase Hがこの方法に用いられているが、感度、選択性、活性いずれにおいてもこれらの酵素を上回るRNase Hの開発が望まれている。

もう一つは、DNAオリゴマーをRNase Hに連結した人口RNA制限酵素の開発である。RNAは、DNAから蛋白質へと遺伝情報を伝えるだけでなく、それ自身多様な構造をとったり修飾を受けたりすることによりいろいろな機能を果たすので、RNA制限酵素の開発は、このようなRNAの構造や機能の研究に役立つと思われる。

さらに、RNase Hに対する酵素阻害剤のペプチドライブラリー法による探索などもすすめている。エイズの原因はHIVというレトロウィルスによる感染であることが知られているが、このレトロウィルスの増殖にはRNase H(逆転写酵素の一部)が必要である。従って、RNase Hの酵素阻害剤はエイズの有効な治療薬として期待されている。

3. 今後の展開

油田細菌の研究においては、CO₂固定あるいは石油分解の経路を明らかにすることが必要かつ急務である。基礎を理解してはじめて応用研究が可能になるからである。この目的のためには、HD-1株やTK122株のCO₂固定あるいは石油分解に関与する酵素群を二次元電気泳動法などにより同定することが有効である。また、CO₂や石油を放射能で標識し、菌体内に蓄積す

る中間代謝物質を同定することも有効である。さらには、CO₂固定能や石油分解能の著しく変化したミュータントを作成し、変化の原因となる遺伝子を遺伝学的方法で同定することも有効である。最終的には遺伝子工学的手法を用いて油田細菌を改良するので、これらの細菌の形質転換系を確立することも必要になる。これらの研究を行うことにより、新しいCO₂固定経路や石油代謝経路が発見されるだけでなく、埋蔵石油の一部は微生物によって作られたという仮説を裏付けるデータも得られるのではないかと期待している。

超好熱菌や好冷菌の研究においては、超好熱菌からいくつか興味深い蛋白質が得られたので、これらの三次構造を学内外のX線結晶解析グループと共同して解析している。まだ結晶化の段階であるが、三次構造が決定されれば、超好熱菌由来蛋白質に特徴的な新規耐熱化機構を見いだせるかもしれない。また、蛋白質の分子進化についても新しい知見が得られる可能性がある。好冷菌由来蛋白質については、まだ構造機能相関を比較検討するのにふさわしい蛋白質は得られていない。しかし、もし類似の構造を持つ蛋白質が好冷菌からも超好熱菌からも得られれば、この蛋白質は非常に広い温度範囲に適應していることになるので、蛋白質の構造、機能、安定性の相関についてより体系的に解析することが可能になる。その結果、蛋白質機能を改変したり新機能蛋白質を創出したりする技術を開発する上で有用な知見が得られるものと期待される。

RNase Hの研究においては、その生理機能や触媒構造、さらには基質認識機構に関しての原子レベルでの理解がさらに深められるものと思われる。また、その過程で蛋白質の構造形成や機能発現を支配する原理あるいは原則を発見する手掛かりが得られるものと期待される。

4. おわりに

本講座は、応用生物学専攻、生物学国際交流センター、さらには京大大学院工学研究科合成・生物化学専攻など、ライフサイエンスの研究に携わる他部局との緊密な関係の下に教育・研究活動を行っている。しかし、本講座は物質・

生命工学専攻に属しており、その目標とするところは、生物、化学、物理の融合した学際的な研究を行うことによりライフサイエンスの先端技術を開発することである。従って、今後は専攻内の分野の異なる研究室とも共同研究を行うことにより、現在の研究テーマをさらに発展させると共に、新しい学際領域の研究分野の開発にも取り組みたいと考えている。

最近の成果

- 1) Hirano, N., Haruki, M., Morikawa, M., & Kanaya, S. (1998) Stabilization of RNase HI from *Thermus thermophilus* HB8 by the spontaneous formation of an intramolecular disulfide bond. *Biochemistry*, in press.
- 2) Morikawa, M., Iwasa, T., Yanagida, S., & Imanaka, T. (1998) Production of alkane and alkene from CO₂ by a petroleum degrading bacterium. *J. Ferment. Bioeng.*, 85, 243-245.
- 3) Kanaya, S., Koyanagi, T., & Kanaya, E. (1998) An esterase from *E. coli* with a sequence similarity to hormone-sensitive lipase. *Biochem. J.*, 332, 75-80.
- 4) Yamasaki, K., Akasako-Furukawa, A., & Kanaya, S. (1998) Structural sta-

bility and internal motions of *E. coli* ribonuclease HI : ¹⁵N relaxation and hydrogen-deuterium exchange analyses. *J. Mol. Biol.*, 277, 707-722.

- 5) Haruki, M., Noguchi, E., Kanaya, S., & Crouch, R. J. (1997) Kinetic and stoichiometric analysis with BIAcore™ for the binding of *E. coli* ribonuclease HI to RNA-DNA hybrids. *J. Biol. Chem.* 272, 22015-22022.
- 6) Akasako, A., Haruki, M., Oobatake, M., & Kanaya, S. (1997) Conformational stabilities of *E. coli* RNase HI variants with a series of amino acid substitutions at a cavity within the hydrophobic core. *J. Biol. Chem.*, 272, 18686-18693.
- 7) Rashid, N., Morikawa, M., Nagahisa, K., Kanaya, S., & Imanaka, T. (1997) Characterization of a RecA/RAD51 homologue from a hyperthermophilic archaeon *pyrococcus* sp. KOD1. *Nucleic Acids Res.*, 25, 719-726.

参考文献

- 1) 梅野正隆：大阪大学工業会誌，平成8年1月号
- 2) 横山正明：生産と技術，48巻1号

