

バイオテクノロジー標準化支援協会ジャーナル **No.105**

SABS Journal No. 105

発行日：2019年1月20日

URL：<http://sabsnpo.org>

このジャーナルはもともとバイオテクノロジー標準化支援協会（SABS）会員向けのものでしたが、広い意味でのバイオテクノロジーにご関係のある方々にも配信しています。ご興味のない方はこのメールに返信して配信無用の旨をお知らせください。

SABS ジャーナルでは、故奥山典生東京都立大学名誉教授がご逝去直前まで毎回様々な分野にわたり溢れる蘊蓄を披露されて居られました。その後、奥山先生のご遺志を継いだ我々が協会を続け発展させて行くため、毎月の定例会を継続し、いろいろな方々がそれぞれ専門の話題を提供し話合って、親睦と勉強を深め、当会の活動の一助となるよう努めて参りました。

現在、このジャーナルを読んで下さる方々は数百名に上ります。ぜひ読者の方々から話題提供をして下さる方をお待ちしています。ご感想、エッセイなどのご投稿も大歓迎です。

大分遅くなりましたが、新しい年を迎え、本年も宜しく当バイオテクノロジー標準化支援協会（SABS）をご支援頂けるようお願い申し上げます。昨年は奥山典生先生からの懸案であった「医学と生物学」復刊事業を何とかスタート出来、10月に至り復刊第1号を発行致しました（<https://medbiol.sabsnpo.org/EJ3/index.php/MedBiol>）。今年は第2号発行に向け、ぜひ皆様のお力添えをお願い申し上げます。短報誌ですので原著に限らず総説、書評、エッセイなどお気軽にどしどしお寄せください。この雑誌の扱う分野は1942年の第1巻から非常に幅広く医学と生物学に関係するあらゆる分野が含まれていて、2013年の最終号では、看護学、老人医学、リハビリ関係、小児科、心理学・精神科、栄養学・食品、薬学関係、臨床医学、解剖学、動物学、生理学、保健予防医学、医学教育、細胞生理学、植物学、歯科、皮膚科、免疫学、臨床検査、環境などなど非常に幅広い分野を網羅していました。お待ちしております。投稿は上記サイトに入って頂くと‘投稿’ボタンがありますのでそこから出来るようにしましたが、未だ使いにくい部分もあるかもしれません。直接添付ファイルとして筆者（檜山 thiyama@athena.ocn.ne.jp）にメール頂いても結構です。

復刊誌は、旧「医学と生物学」と同様に医学中央雑誌に登録し、投稿原稿は受付してから2週間以内に査読を完了し受理の可否を投稿者に伝え、また原則として受理した投稿論文は受理から1カ月以内に掲載するつもりです。総説、エッセイなども歓迎です。Chemical Abstract などにも掲載され国際的に認められていた速報誌の復刊です。

重ねて、このニュースレターをお読みの皆さまにもぜひご投稿頂きたくよろしくお願いたします。

さてバイオの話題を一つ。この冬はインフルエンザが例年より遥かに多発し始めました。筆者の周辺でも今年に入って新年会やクラス会の欠席者が多発、遂には毎日保育園の送り迎えなど面倒をみている2歳児の孫が高熱を出し医師にA型インフルエンザと診断されました。いつも遅れるこのニュースレターがまたまた遅れた言い訳にはなりません、新しい特効薬の話をはば1年前このレター（SABS Journal No. 97）に書いていたのでまた少し勉強してみました。昨年はタミフルに代わるゾフルーザという国産特効薬のお話でした。（<https://style.nikkei.com/article/DGXKZO36970380W8A021C1TCC000?channel=DF140920160921>）

この薬は1回ですむこともあり段々普及し始めているようです。タミフルが感染した細胞から増殖したウイルスが出てくるのを阻害するのに対し、ゾフルーザはウイルス特有のキャップ依存性エンドヌクレアーゼの阻害剤で増殖を抑えてしまう薬です。今回紹介するのは別の原理で増殖を抑えるやはり純国産の薬です。これは富山大学の白木公康教授が富士フイルム富山化学と開発したアビガン（Avigan）という物質です。ファビピラビル（Favipiravir）とも呼ばれるこの物質は、構造的には6-fluoro-3-hydroxy-2-pyrazine carboxamideで、ピリミジン塩基（RNAの場合CとU）のアナログの一種です。

（<https://ja.wikipedia.org/wiki/%E3%83%95%E3%82%A1%E3%83%93%E3%83%94%E3%83%A9%E3%83%93%E3%83%AB>）

アナログは「似て非なるモノ」で、基質に「似て非なるモノ」はしばしば阻害剤になります。しかしこの物質はRNA塩基の6員環ピリミジンに対して5員環（ピラジン）で余り似ていないので‘普通’のRNA polymeraseは相手にしませんが、RNAウイルスのRNA polymeraseは取りこんでしまいウイルス合成がストップしてしまいます。‘普通’というのは、人も含めた細胞のRNA polymeraseという意味で、すなわち副作用が少ないことが期待されるということです。この薬は初めインフルエンザ用に開発されたのですが、発表した2000年は丁度タミフルが出た直後であったためRNAウイルス一般に効く事が分かり世界的な脚光を浴びたのは2007年以降でした。それは、致死性の高い鳥インフルエンザやマダニ感染、更には恐ろしいエボラ出血熱（致死率50-90%）にも効果が出てきて、いろいろな国で備蓄を始めている様です。耐性株が出現しにくいなど大きなメリットもあり発展が期待されます。治療薬の少ないウイルス病に新たな武器、それも我が国で開発されたものが増えるのは大変喜ばしいことだと思います。余談ですが筆者の孫はタミフルを処方され5日間も飲まされお陰様で元気です。やはり医師はタミフルのように実績のある薬を選んでしまうのでしょうかね。

前回（12/7）の話題提供は佐竹/奥山研 OB の鈴木春男北里大学名誉教授にお願いしました。鈴木先生は都立大佐竹/奥山研究室での卒業研究を経て、東大理学部大学院生物化学専攻に進学、小倉安之教授のもとで酵素学の研究に携わり学位取得、その後米国の University of California, San Diego、愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所主任研究員を歴任し、

1978 年から北里大学医学部、更に理学部の教授を定年まで務められました (<https://researchmap.jp/read0024306/>)。今回は、「酵素反応中の基質と生成物の通路」という題でお話をして頂きました。お話は、最近 2, 30 年の間に立体構造が詳細に解明され、新たな知見が得られてきた酵素の反応機構についてでした。

永いこと、酵素による触媒反応は、酵素タンパク質が基質と複合体を生成して起こるといふ Michaelis - Menten の機構で説明されています。現在でもこの考え方は概ね正しいと言えますが、近年、酵素や酵素-基質、酵素-生成物複合体の立体構造や動的性質についての研究が進んだ結果、酵素の働きの詳細な仕組みが分かって来ました。特に、1 つの酵素複合体が 2 反応以上の触媒能を持つ多機能酵素において非常に興味深い反応機構の詳細が分かってきました。先生のお話はまず生化学の教科書にも取り上げられている Trp synthase (トリプトファン合成酵素) について解説して頂きました。この酵素ではそれぞれ別のサブユニットで触媒される 2 種の反応が逐次進んでいきます。始めの反応で生成した中間体、それは次の反応の基質になるのですが、その中間体がサブユニットの組み合わせ構造の中にできるトンネル状の穴を特異的に通過して次の触媒サブユニットの反応中心部に能率よく運搬されていくということが立体構造的に解明されているということです。鈴木先生は、4 量体型 sarcosine oxidase とその酵素基質複合体を結晶解析し立体構造をきめました。定年後もグループを作りポーランドの研究室が開発した立体構造の中にできているトンネルを探し出すソフトウエアを使って解析し、この複合酵素にも中間分子が通り抜ける構造も見付けて複雑な反応機構を研究して来られました。sarcosine oxidase は臨床検査で peroxidase と組み合わせずザルコシンの定量に使われるため、大量に入手でき、また解析プログラムはネットで入手でき自由に使えるとのことでした。

さて、今回の話題提供は理事の小林英三郎氏のご紹介で NPO 法人チームくじら号代表の加藤千明先生にお願いすることと致しました。話題は「生命の探索は深海・地殻内、そして宇宙へ・・・」です。先生から頂いた要旨を以下に転載させていただきます。

深海に生きる生き物たちは、高い水圧下に適応した不思議な生き方をしています。最新の研究から、こうした生物の遺伝子の発現・制御から酵素蛋白質の働きに至るまで、圧力に依存しているメカニズムが明らかになってきました。さらに、深海の海底下には多様な地殻内微生物の世界が広がっており、こうした研究は生命の起源・地球外生命の探索研究へと大きく広がりを見せております。本講演では、以下の項目について解説いたします。

1. 深海生物の生き様の不思議～地球を食べる・高水圧下への適応戦略
2. 極限生物の探索は、深海から地殻内へ～下北八戸沖、海底下 2500m の世界
3. 深海研究が宇宙生命探査に直結～土星の惑星エンケラドスでの熱水の発見
4. おわりに～宇宙に広がる極限生命・・・

さあ、みなさん、今回のお話から未知の極限環境下の生命に思いを寄せてみませんか！

添付資料：加藤千明（2017）【特集】生命科学における高圧力研究の異分野融合「深海世界と高圧力下の生命」高圧力の科学と技術、27 (1), 3-12.

バイオテクノロジー標準化支援協会 第93回 定例会

日 時：2019年1月25日(金) 14時00分 - 16時00分
場 所：八雲クラブ（首都大学東京/東京都立大学同窓会）
（渋谷区宇田川町 12-3 ニュー渋谷コーポラス 10階）
話 題：「生命の探索は深海・地殻内、そして宇宙へ・・・」
演 者：NPO 法人チームくじら号 代表 加藤千明、Ph.D.

定例会はどなたでも参加できます。今回は恒例で講演の後、簡単な新年会を開きます。特に「医学と生物学」に関心をお持ちの皆さまのご参加をお待ちしています。

定例会会場八雲クラブへの道順

渋谷駅ハチ公交差点から井の頭通りの坂道の右側を東急ハンズの看板目指して上り、ハンズの手前で右の急坂を登ります。直ぐ左に曲がり坂道が平になりかけた左側にあるかなり古いマンションがニュー渋谷コーポラスです。入口奥のエレベーターで10階に上ると直ぐ左隣の部屋が八雲クラブです。

定例会は原則として毎月第4金曜日 14:00-16:00 に八雲クラブで開いています。例外として7月、8月および11月はお休み。12月は第1金曜日に忘年会を兼ねて行います。会員でも会員でなくても自由に出席して、自由に発言出来ます。友人同士お誘い合わせでご出席ください。

このジャーナルは現在檜山が毎回拙文を執筆していますが、ぜひいろいろな方々にご投稿頂ければと思っております。内容・字数は自由です。また定例会での話題提供も大歓迎です。時間は2時間程度ですが短くても長くても（その場合は2回以上に分けますが）また内容も自由です。ぜひ皆さまのご参加をお待ちしております。

当会ホームページ<<http://www.sabsnpo.org>>をご覧ください。本メールジャーナルのバックナンバーが収録してあります。また**刊行雑誌**のタグをクリックして頂くと「医学と生物学」をご覧になれます。

- ① 配信停止・中止希望は下記アドレスにメールにてその旨お知らせください。
- ② 配信先等の登録情報変更は メールにてその旨お知らせください。
- ③ バイオテクノロジー標準化支援協会に新規会員登録をご希望の方はメール下さい。
- ④ ウェブサイトに関するご意見もメールにて頂ければ幸いです。

(NPO) バイオテクノロジー標準化支援協会

NPO Supporting Association for Biotechnology Standardization (SABS)

〒173-0005 東京都板橋区仲宿 44-2

E-mail: thiyama@athena.ocn.ne.jp

URL: <http://www.sabsnpo.org>

理事：荒尾 進介、小林 英三郎、田坂 勝芳、松坂 菊生、檜山 哲夫

監事：堀江 肇

ネット管理：川崎 博史、田中 雅樹

4 このファイルの頒布は著者およびその所属機関に限って許諾されています。

私たちの世界と深海世界との間には「高水圧」という大きな壁が存在していて、私たち大気圧下に適応している人類にとっては、容易に深海へアクセスできなかったという歴史がその主な原因であった。

しかしながら、近代の急速な科学技術の発展に伴い、19世紀の末頃には、深海底からドレッジ法（海底の地面の表層を削ってサンプリングする方法）による生物採取が試みられ、これまで砂漠のような無生物の世界であると思われていた深海世界にも、多種多様な生物が生息（現場環境で生存）していることが知られるようになった。そして、1950年には、アメリカの微生物学者たちにより、深海底には高水圧下の世界に好んで生息する生物、好圧性生物が存在するであろうことが予測された。その後約四半世紀を経て、微生物の高圧力培養技術の確立や各種の有人、無人潜水調査船等の開発・運用が行われるようになり、ようやく1970年代後半にスクリプス海洋研究所のアート・ヤヤノスらにより、フィリピン海溝やマリアナ海溝などの超深海域から、大気圧下よりも高圧を好んで生育（現場環境で増殖）する新規の好圧性微生物の分離に成功したのである[1]。それまで、深海底サンプルから分離された微生物の多くは、単に耐圧性が高いというだけで、大気圧下でも良好に生育できるものであったが、ヤヤノス博士らにより大気圧下では全く生育できない「絶対好圧菌」も発見され、深海底には高圧力環境下に適応した未知なる生命世界が広がっていること

が理解された。Fig. 2に、微生物における生育能力と圧力との相関を図示し、それぞれ、耐圧菌(Piezotolerant)、好圧菌(Piezophile)、絶対好圧菌(Obligatory piezophile)を示した。またあわせて、微生物の加圧培養に利用される加圧容器各種の写真を紹介した。

2. 世界最深海域・マリアナ海溝

高水圧下の生命世界を論じるにあたって、まず世界最深・最高水圧海域であるマリアナ海溝・チャレンジャー海淵（水深約11,000 m, 約110 MPa）への挑戦について解説する。チャレンジャー海淵という場所は、1872年から実施されたイギリスのチャレンジャー号探検航海で発見された世界最深海域で、1995年5月のJAMSTEC（海洋研究開発機構）による無人潜水調査船「かいこう」の調査により、水深100,911 mと計測され、これが世界最深海底の公式記録として今日に至っている。チャレンジャー海淵への人類最初のアクセスは、1960年、ジャック・ピカールによる潜水船「トリエステ号」による冒険潜航がよく知られている。彼の父（オーギュスト・ピカール）は世界で初めて気球を開発した技術者として有名な人であるが、トリエステ号の潜航の原理は、気球相当部分に水よりも軽い液体、ガソリンを入れ、気球の籠に相当する部分に耐圧球を設置して、その中に人が乗り込み、おもりを持って潜航

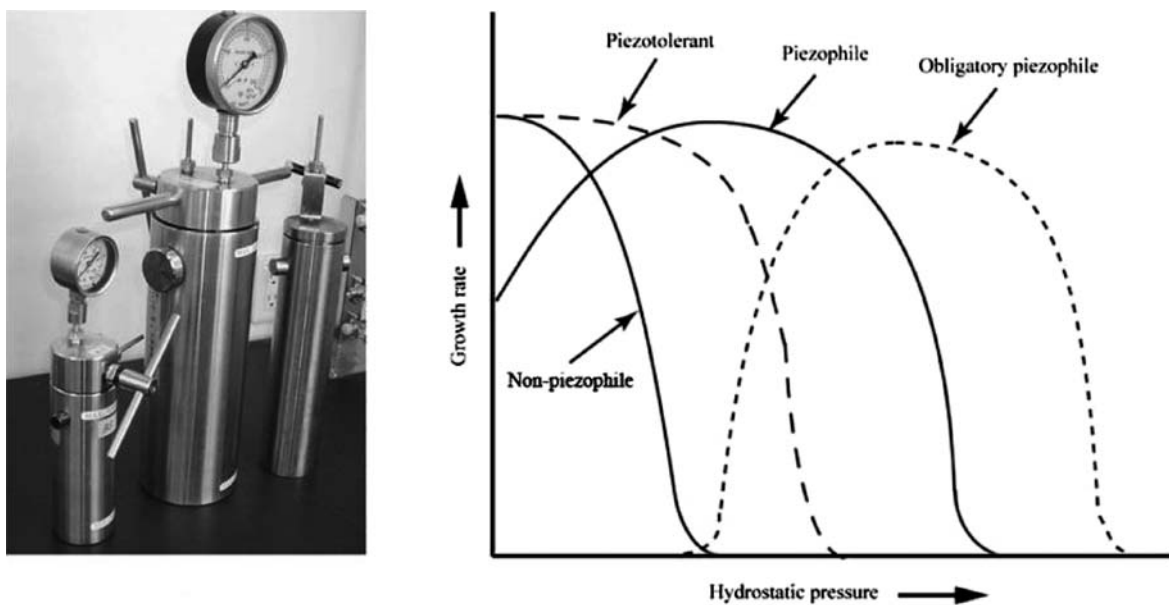


Fig. 2. Definition of piezophilic growth properties (right) and pressure vessels for cultivation of piezophiles (left).

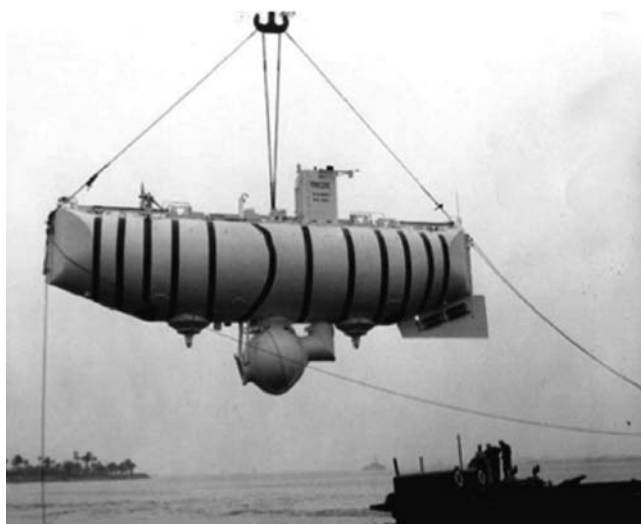


Fig. 3. First developed manned submersible, “TRIESTE II”, in that, J. Picard went down to the deepest Mariana Trench.

し、おもりを廃棄することにより浮上する、いわば気球の原理を海洋の水環境に応用したものとして設計・製作された (Fig. 3)。この潜水方式は、今日においても「しんかい 6500」等の大深度有人潜水調査船の潜航原理の基本となっており、彼らの発想がいかに先進的でしたらしかったかが理解できる。

ピカールはその著書[2]で、チャレンジャー海淵の底で、Flat-fish (カレイやヒラメの仲間) を見たと記述しているが、残念ながらその写真や映像などは記録されていない。今日では、魚類など脊椎動物の骨を形成するリン酸カルシウムや、貝類などの殻を形成する炭酸カルシウムなどは、マリアナ海溝の深度では、その水圧と塩分濃度により安定に存在し得ないこと(炭酸塩補償深度)から、チャレンジャー海淵の底には魚類や貝類は存在し得ないと思われる。従って、彼が見た Flat-fish は、何らかの無脊椎動物(ナマコなど)を見間違えた可能性が高い。最近では、ハリウッド映画「タイタニック」や「アバター」の制作で世界的に著名な映画監督であるジェームズ・キャメロンが、2012年3月に自ら設計した一人乗り有人潜水船「ディープチャレンジャー号」でチャレンジャー海淵に潜航し、最深部での試料採取や映像撮影にも成功した[3]。その時の映像記録を含めて、今日まで我々のすべてのマリアナ海溝底調査からも、この世界最深部に魚や貝がいたという話はいまだ伝わってきていない。

マリアナ海溝における微生物の採取に関しては、

1976年に *Pseudomonas bathycetes* というバクテリアの分離例があるが、この菌は中温性で大気圧下に適応しており、現場水深の圧力・温度では極めて生育が悪いことから、浅海域から落ちてきたか、あるいは海水中に混入していた微生物である可能性が高い。我々は、1996年2月に「かいこう」のマリアナ海溝調査に参加し、チャレンジャー海淵・水深10,898 mの海溝底より、世界で初めて無菌採泥器(海水中の微生物の混入が無いように工夫して制作された採泥器)によるピンポイントでの底泥のサンプリングに成功した (Fig. 4)。異物混入無しに得られた泥サンプルは、船上にて直ちに冷却され、加圧容器を用いて現場の圧力・温度の環境(100 MPa, 4°C)にて保管し、また同時にこの圧力温度条件にてプライマリーカルチャー(初代培養)を開始した。その後、加圧条件下での微生物の分離作業をおこない、最終的に2種の絶対好圧性微生物、*Shewanella benthica* DB21-MT2と *Moritella yayanosii* DB21-MT5 とが分離された。これらの絶対好圧菌は共に、50 MPa以下の圧力では生育せず、それぞれ、70 MPa, 80 MPaにその生育の至適圧力を持っていて、現場環境の110 MPaでも良好に生育できる超絶対好圧菌であることが明らかとなっている[4]。

我々の観察では、マリアナ海溝底はナマコや甲殻類等の無脊椎動物が数多く見られ、密集して生息している様子がうかがわれた。また、サンプリングされた底泥に含まれていた有孔虫は、通常の炭酸カルシウムの殻ではなく、マリンスノーとして落ちてきた海洋表層の植物プランクトンの死骸に含まれるシリコン性の素材を使って自分の体の周りに貼り付けていた様子が確認された (Fig. 5)。先ほども触れたが、炭酸カルシウムはマリアナ海溝底のような超高压の世界では、固体としては不安定で海水中に溶け出してしまうので(炭酸塩補償深度)、確かに炭酸カルシウムの殻で覆われた生物(貝類など)をここで見ることはなかった。Fig. 5bの写真であるが、一見すると魚類のようにも見えるが、これらもナマコの1種であることが確認された。前述したピカールが見たとされる Flat-fish は、実はこうした生物が魚のように見えたのではないかと推測される。なお、マリアナ海溝底に数多く生息している「カイコウオオソコエビ」には、いくつかの新奇の難分解性物質を分解できる有用酵素が含まれていることが、2013年に報告され、現在再びマリアナ海溝の生き物たちが注目されはじめてきている[5,6]。

6 このファイルの頒布は著者およびその所属機関に限って許諾されています。

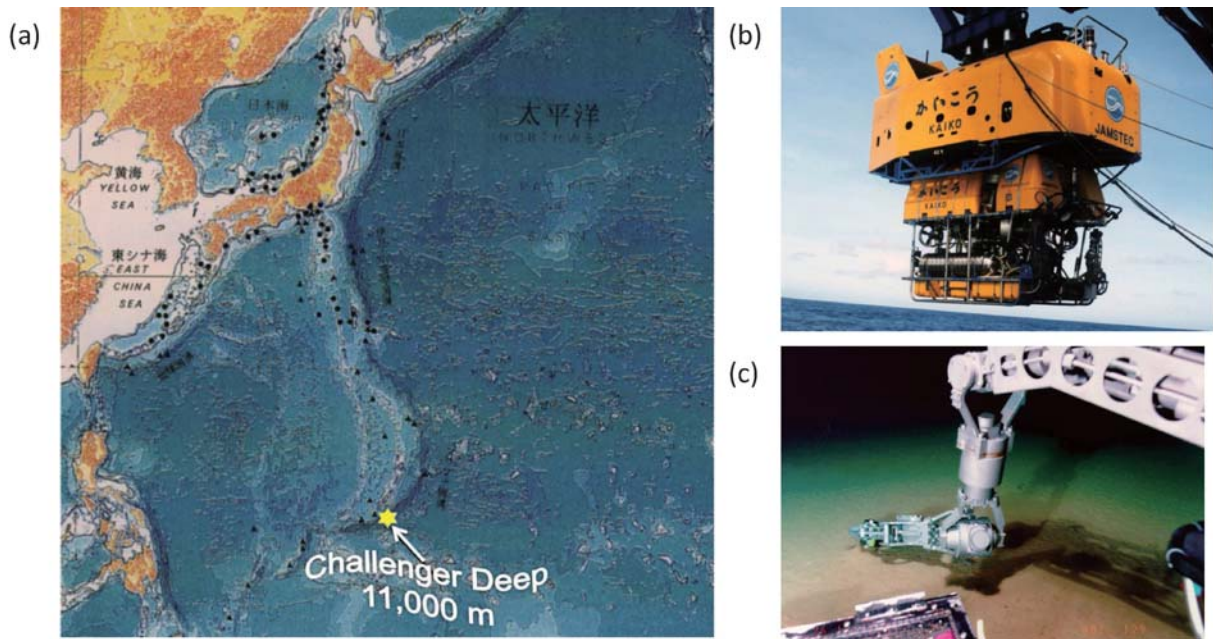


Fig. 4. Sediment sampling at the Mariana Trench Challenger Deep by means of the unmanned submersible, “KAIKO” system, Dive 10K#21 in 1996. (a) Map of the site, Challenger Deep, the Mariana Trench. (b) Unmanned submersible (ROV), “KAIKO”. (c) Sterilized sediment sampling at the Challenger Deep.

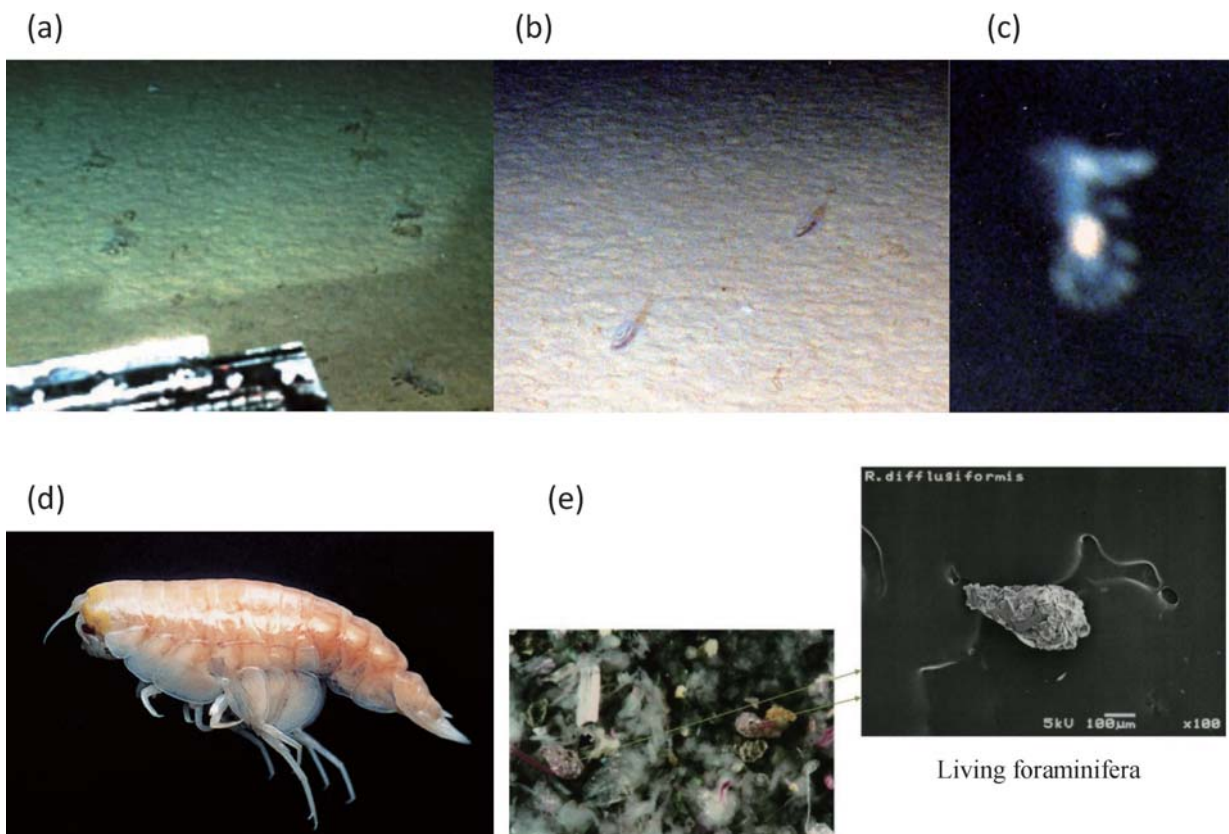


Fig. 5. Animals living at the deepest Mariana Trench. (a) Bottom of the Challenger Deep. Many sea cucumbers were observed. (b) Sea cucumbers looked like fish? (c) Swimming sea cucumber. (d) *Hirondellea gigas*, living at the Challenger Deep. (e) Deepest foraminifera, that covered by silicate.

3. 生物の高圧力適応戦略

一般的に、高圧力条件は生物にネガティブな効果をもたらすことが多い。加圧により微生物を殺菌する方法として、高圧殺菌法が普及しているが、これは圧力により食品等に混入している微生物を失活させ、食品等を腐敗から守るといった効果をもたらす。微生物殺菌法としては、昔から加熱による殺菌法が広く普及してきているが、対象食品によっては加熱により蛋白質等の素材の変性が起こり、栄養分の損失、異臭の発生による風味の消失、異常物質の生成、さらには、エネルギーの大量消費が必要などの種々の問題点が指摘されている。そこで、こうした加熱加工の手法に対して、非加熱加工が脚光を浴びるようになってきたが、なかでも高圧殺菌法は食品加工に応用されることで大きな成功を収めてきた一大分野である[7]。加熱加工と高圧力加工とでは、いずれも生物に対してネガティブな効果をもたらすが、対象素材に対するダメージの蓄積が大きく異なる。例えば、蛋白質に対しては、加熱では不可逆的な変性（熱変性）をもたらす活性を回復させることは不可能であるが、加圧では微生物が失活する程度の圧力（500 MPa 程度）までは、多くの場合可逆的で、加圧下では活性が失われていても大気圧下に戻すと活性が回復する。すなわち、生物に対する圧力効果は活性を失う方向に向かうとしても、加熱効果と比較して非常にマイルドである。

Fig. 6 に、蛋白質の変性 (Denatured) における圧力と温度の効果を示した[8]。図中、着目すべき箇所を点線で示したが、蛋白質が変性する温度条件でさらに加圧すると非変性 (Native) な状態に戻るといった領域が存在する。すなわち、加圧の効果として、対象物質に対してあたかも温度を下げたかのような状態をもたらすのである。このことは、対象物質が蛋白質である場合だけでなく、微生物の殺菌プロセスや増殖に対しても、圧力が同様な効果を与えていることが確認されている。すなわち、殺菌プロセスでは、大気圧下で死滅する温度に、ある程度の圧力を付加すると殺菌効果が失われることや、また増殖に対しても、その生育上限の限界温度において加圧すると生育が復活し圧力によりその上限温度がさらに上昇するという実験的な結果が得られている[9]。

加圧が細胞生物学的に温度降下と同様な効果をもたらすもう一つの証拠として、細胞膜の流動性ととの

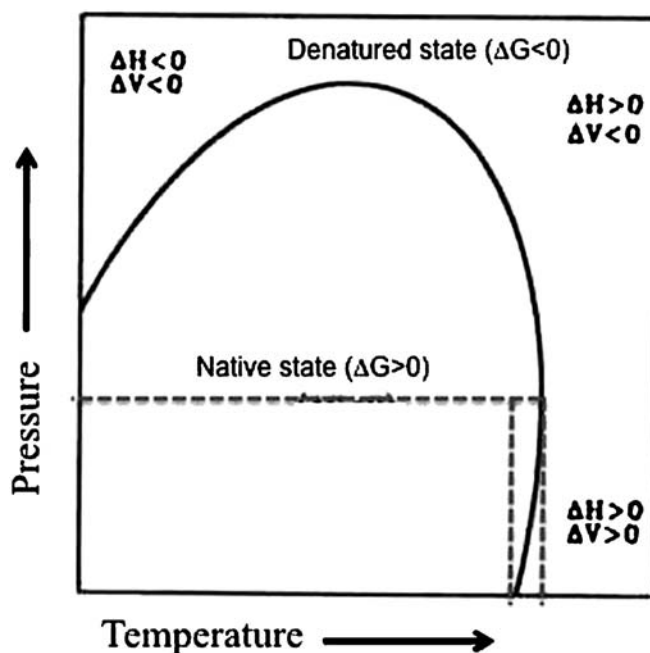


Fig. 6. Effect of temperature and pressure for the protein denaturation.

相関があげられる。一般に細胞が低温環境に適応するためには、細胞膜の低温液晶化を防ぐために、細胞膜の主要構成成分である脂肪酸において、含有飽和脂肪酸を固化温度がより低温側となる不飽和脂肪酸へと作り替えていくことが知られている。細胞を加圧条件下においたときも同様に、圧力下における細胞膜の流動性を確保するために、含有脂肪酸の不飽和化をもたらしている[10]。実際に、高圧環境下の深海から分離された好圧菌ではその細胞膜脂肪酸の不飽和化率が極めて高く、70%を超える不飽和脂肪酸を含有しているものも多く存在している。ちなみに、生物の持つ主要生体物質である、核酸、蛋白質、脂肪酸の3つの物質の圧力効果を比較すると、脂肪酸がもっとも圧力に対して感受性が高く、深海の水圧範囲である50~100 MPaの圧力下で顕著な構造変化を受ける。そうした意味で、深海生物は細胞膜で環境圧力を検知していて、膜含有の脂肪酸で圧力のセンシングを担っていると考えられている。次項から、我々がこれまで取り組んできた加圧応答する遺伝子発現の仕組みと、深海微生物における深海高圧環境への適応戦略について述べる。

4. 遺伝子発現の加圧応答

深海微生物の遺伝子発現応答はその生育圧力環境

によってコントロールされていることが、1989年に Bartlett らにより報告された[11]。彼らは、大気圧でも生育できる中程度の好圧菌、*Photobacterium profundum* SS9 株を用いて、その外膜蛋白質 OmpH の発現が圧力により制御されていて、加圧下でのみ発現することを見いだした。こうした圧力制御の仕組みは、当初は深海に適応している微生物の特徴であるかのように考えられたが、その後、大腸菌を材料として用いた実験により、遺伝子発現の圧力制御はどのような微生物においても起こりうるものであることが明らかとなった[12]。驚くべきことに大腸菌を宿主とした遺伝子発現系として一番よく利用されている *lac* プロモーター（遺伝子発現調節因子）系において、その発現が顕著に加圧応答する様が見られたのである[13]。これらの遺伝子発現は、通常は発現誘導物質である IPTG（イソプロピル- β -チオガラクトピラノシド、ガラクトース類似体）を添加することによって初めて発現誘導されるのであるが、*lac* プロモーターの場合 30 MPa、*tac* プロモーター（*lac* プロモーターをより強力発現型に改変したもの）の場合 50 MPa の加圧下とすることによって、IPTG 抜きでも顕著に発現誘導されるという事実が見いだされた (Fig. 7)。これらのプロモーター遺伝子配列の下流には、発現調節部位（オペレーター）が存在し、LacI と呼ばれる遺伝子発現を阻害する蛋白質が 4 量体として結合している。通常大気圧下の条件では IPTG が LacI に化学的に結合し、オペレーター部位への結合を解除し、遺伝子発現が誘導される。我々の結果は、こうした発現誘導剤抜きでも、高圧力が LacI 複合体の構造を変化させ、オペレーター部位への結合を解除して、遺伝子発現が加圧応答で起こったことを示したものである。この発見から、大気圧下に適応している微生物でも、加圧応答の遺伝子発現制御が広く認められることが示され、圧力印加によりこれまで見えてこなかった生命現象を見ようとする「圧力生理学」という新しい学問研究分野を開拓するきっかけともなった。

その後の研究から、深海微生物において加圧応答する遺伝子がいくつも発見・報告されている。我々の研究室では、琉球海溝、深度 5,110 m より分離された、*Shewanella violacea* DSS12 株をモデル好圧菌として用いて、詳細に加圧応答する遺伝子の発現機構について研究を行ってきた。本好圧菌は、その生育至適条件を 30 MPa、8°C にもつ好冷性好圧菌

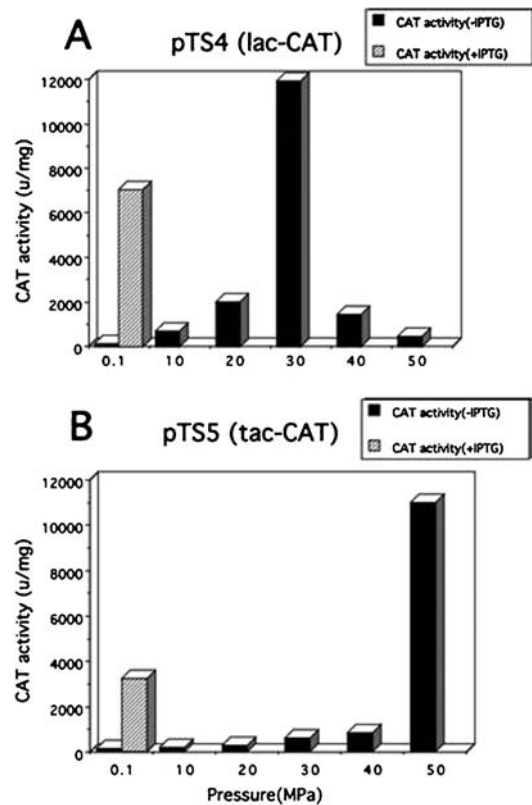


Fig. 7. Pressure effect of gene expression controlled by *lac* (A) and *tac* (B) promoters in *Escherichia coli*. CAT: marker gene, coding on chloramphenicol acetyl transferase.

でもあり、大気圧から 70 MPa まで良好に生育できるので遺伝子発現の加圧応答を見るには非常に都合のいい微生物でもある[14]。その結果、特に窒素代謝に関連のある RNA ポリメラーゼ RpoN（シグマ 54 因子）が認識する遺伝子プロモーターに、共通して加圧応答する遺伝子が存在することを発見し、RpoN 認識プロモーターの発現誘導に関わる転写因子、NtrB、NtrC の発現が引き金となって、加圧応答遺伝子発現カスケードが促進されるモデル（仲宗根・加藤モデル）を提唱した[15]。Fig. 8 にこの遺伝子発現の圧力応答モデルを示した。本好圧菌においては、環境圧力の変化を細胞膜中に存在している圧力センサー蛋白質として機能する NtrB が認識して、自己リン酸化される。そして、リン酸化された NtrB はそのリン酸を細胞質蛋白質である NtrC に伝達し、リン酸化された NtrC が転写因子として RpoN を活性化させ、遺伝子発現を誘導するというメカニズムである。RpoN が認識するプロモーターに制御される遺伝子の代表である *glnA* は、グルタミン酸合成酵素をコードしている遺伝子で、細胞が

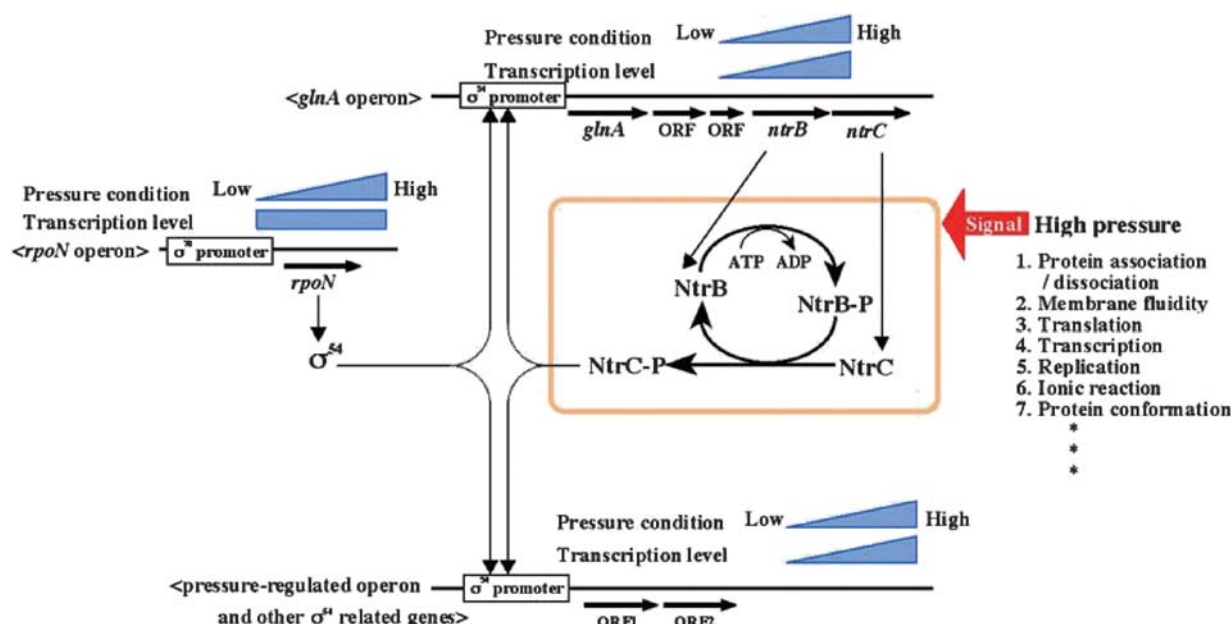


Fig. 8. (Color online) Model for the transcription mechanisms of pressure-regulated gene expression in piezophilic *Shewanella violacea* strain DSS12.

窒素飢餓状態になったときに特異的に発現する遺伝子である。この *glnA* 遺伝子の下流にそれぞれセンサー蛋白質、転写因子をコードする *ntrB*, *C* 遺伝子がオペロン（複数の遺伝子が一つのプロモーターにより発現制御されている遺伝子群）をなして存在しており、更に大量の NtrB, C 蛋白質を発現させ、この加圧応答カスケードが回転する。深海環境は元々窒素飢餓状態であり、こうした窒素飢餓に対応する細胞応答メカニズムが加圧応答する遺伝子発現の一端を担っていることは非常に興味深い。

5. 酵素蛋白質における高圧適応戦略

深海微生物の生産する酵素蛋白質を調べていくと、高水圧下の環境でもその活性を維持しているものが多い。多くの常圧環境に適応した微生物の酵素が、加圧に従いその活性を失うのとは大きな違いである。深海微生物の高圧適応戦略を詳細にみていくと、前述した細胞膜脂肪酸の不飽和化、遺伝子発現の圧力制御などと絡み合っており、その生産する酵素や機能蛋白質の耐圧化戦略も非常に重要なファクターとしてあげられる[16]。ここでは、我々の研究室を中心に調べられてきた、酵素の耐圧性と構造に関する最新の知見について紹介する[17]。

我々は、マリアナ海溝チャレンジャー海淵の底泥より分離された絶対好圧性微生物 *Shewanella ben-*

thica DB21MT-2 株の耐圧性の酵素蛋白質、イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素 (IPMDH) について、アメリカのオネイダ湖で分離された常圧菌 *Shewanella oneidensis* MR-1 の IPMDH をコントロールの常圧酵素として検討した。IPMDH は、生物に必須なアミノ酸であるロイシンの生合成過程で働く重要な酵素蛋白質である。常圧酵素 SoIPMDH と絶対好圧菌の深海酵素 SbIPMDH とはアミノ酸配列や立体構造はほとんど同様であったが、前者は 150 MPa では活性が 50% 程度まで減少する圧力感受性であるのに対して、後者は 90% 近くの活性を維持している耐圧性酵素であった。そこで、ダイヤモンドアンビルセルとシンクロトロン放射光の高エネルギー高輝度の X 線を用いて、高圧条件下における蛋白質立体構造を調べたところ、常圧菌の酵素 SoIPMDH において、高圧力によってその活性部位の裏側のくぼみの部分に水分子がクサビのように割込んで行く様子がみられた。その水分子の場所を確認すると、266 番目のアミノ酸付近に存在し、そこは常圧菌ではセリン (S266) であるものが絶対好圧菌ではアラニン (A266) であった。そこで、常圧菌の酵素の Ser を Ala に置き換えた人工変異型酵素 (SoIPMDH-S266A) を作成し高圧分光光度計を用いてその耐圧性を調べたところ、絶対好圧菌酵素並みの耐圧性を獲得していた。また、逆に絶対好圧菌酵素の Ala を Ser に置き換える (SbIPMDH-A266S) と

耐圧性を失った。すなわち、本酵素の全体で 364 個のアミノ酸のうち、たった 1 つのアミノ酸の違いで深海型酵素が常圧型酵素になり、逆に常圧型酵素が深海型酵素になったりする事が明らかとなった (Fig. 9)。

さらに、これらの変異型酵素を結晶化し高圧条件下における立体構造を調べたところ、266 番目のアミノ酸が常圧酵素型の Ser の場合、活性中心の裏側に存在するくぼみ部分に 3 つの水分子が留まるのに対し、深海酵素型の Ala の場合は、これらの水分子が留まらないことが観測された。つまり常圧酵素が圧力に対して感受性であるのは、加圧条件下においてこのくぼみ部分に水分子がクサビ状に侵入し、親水性アミノ酸の Ser と水素結合することによって酵素分子の動きが抑制されることで酵素活性が阻害されるという現象が起こったからと推定された。それに対して深海酵素ではこの部分が疎水性アミノ酸の Ala であるため、加圧下でも水分子が結合できずクサビ状に留まらないため、活性発現に重要な分子の柔軟性が補償されているというメカニズムが示された (Fig. 10)。

これまで長い間、深海生物の深海高圧下への適応戦略というものは、とても複雑でいくつもの要素が絡み合っていると考えられてきていたが、蛋白質個々の機能に焦点を当てれば、意外と単純にアミノ酸のレベルで議論ができることが示唆された。この結果から、高圧構造解析のデータを利用して、既知の蛋

白質に深海生物の耐圧機能を付加するという技術的な可能性を示すことができた。今後は、基礎研究の面からは、蛋白質における高圧適応の一般則を導き出すという研究を推進するとともに、応用面としては、圧力を利用するバイオテクノロジー分野において、工業利用酵素に耐圧性を付与するという技術開発がさらに進んでいくことが考えられる。さらには、食品科学分野等での加圧によるアレルギー物質の分解や除去、高圧バイオリクターへの利用などの展開も期待されている。

6. おわりに…圧力生理学の提唱

これまで述べてきたように、圧力という条件は個体としての生物だけではなく、組織や細胞、また細胞を形成する生体分子に至るまで、あらゆる次元で影響を与えていることがわかる。現在では、種々の高圧測定装置の開発も進み、さらに詳細に、たとえば、蛋白質の立体構造の圧力変化やアミノ酸に結合・解離する水分子の一つ一つの挙動まで観察することが可能となってきている。そうしたことを含め、高圧力下での生命現象を明らかにすることを目的として、阿部らにより、「Piezophysiology = 圧力生理学」という新しい学問分野の提唱がなされた [18]。圧力生理学というのは、生きた細胞や生物個体そのものに圧力を加え、そのレスポンスを解析することにより今まで生物学的に未知であった新奇な生命現象を解明しようとするものである。Fig. 11 に、圧力生理学の概念図を示した。本稿にて記述した、細胞膜脂質の不飽和化戦略や、遺伝子発現の圧力制御、蛋白質の圧力適応等に関する研究なども、圧力生理学研究の範疇に含まれる。これまで、圧力生物科学分野では、その多くが既知のモデル蛋白質を用いた研究を中心としていたが、元々高水圧環境に適応して生息している深海生物や微生物を材料とした研究例は筆者らの研究例を除けば、ほとんどなされていない。深海の生き物たちは、その長い深海環境に対する適応戦略の中で、その生育に必須の機能を有する生体物質を耐圧性に作り替えてきていることが考えられ、今後ますますこうした生物を材料とした研究が高圧力研究の中で重要な位置を占めていくことは間違いない。

今後は、高圧力下での構造の変化などから、深海微生物の有する生体物質の耐圧化戦略の一般則を導き出し、圧力による体積変化と生体物質の安定化と

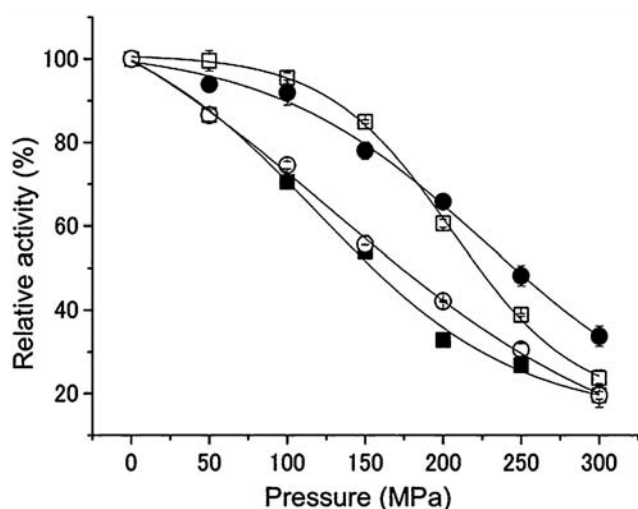


Fig. 9. Comparison of the mutant IPMDH activities at elevated pressure conditions. ●: Deep-sea SbIPMDH, ○: SbIPMDH-A266S, ■: Shallow water SoIPMDH, □: SoIPMDH-S266A.

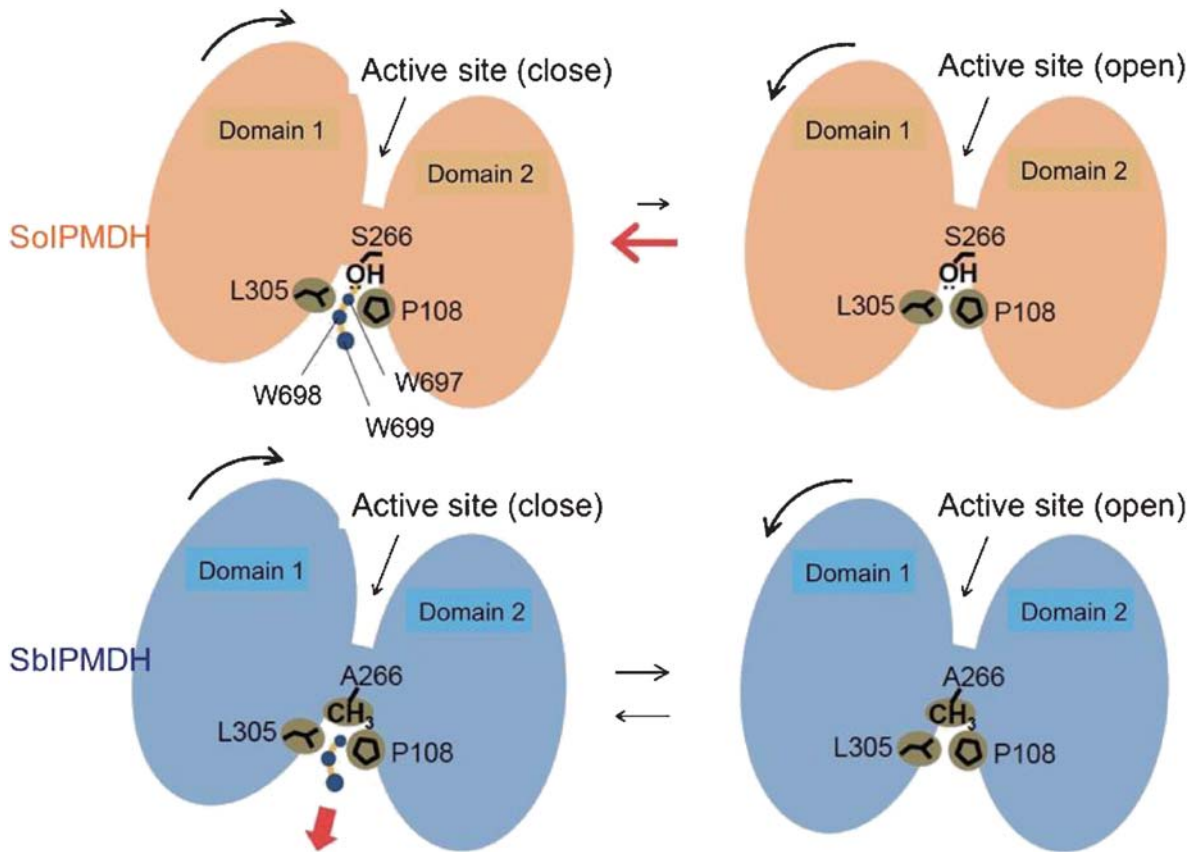


Fig. 10. Dynamic model for the IPMDH activities at the high-pressure condition. In the case of the pressure sensitive SoIPMDH, high-pressure effected three water molecules (W697-W699) penetrated into the just back pocket of the active center to bind the hydrophilic S266, then those water molecules made the stacking for the flexibility of the active center. In the case of the pressure tolerant SbIPMDH, water molecules were not able to bind to the hydrophobic A266, then the molecules were getting out under pressure condition, therefore, the flexibility of the active center was conserved.

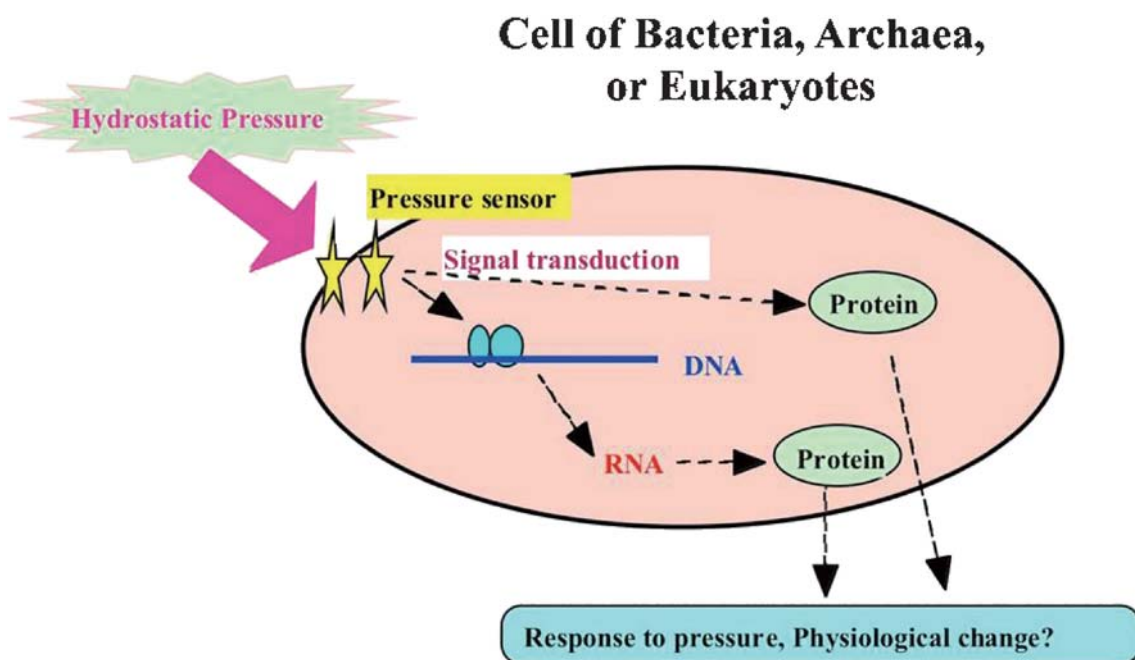


Fig. 11. A schematic diagram of Piezophysiology.

の相関を明らかとしていくことが望まれる。今後ますます、圧力生理学の研究材料としての好圧性微生物や深海生物の利用がなされていくことであろう。

謝 辞

本論を執筆するに際し、筆者を極限環境微生物学から深海微生物学研究の魅惑的な世界へ導いてくれた、故 掘越 弘毅 先生の鋭い洞察と、厳しくもまた暖かかった叱咤激励に深く謝意を表します。また、長年にわたる深海研究で共に汗を流し、泣き笑った同僚、学生たち、国内外の共同研究者の友人たちにも心より謝意を表します。

参考文献

- [1] A.A. Yeyanos, A.S. Dietz, R. Van Bostel: *Science*, **205**, 808 (1979).
- [2] J. Piccard, R.S. Dietz: *Seven miles down*, (G.P. Putnum, New York, 1961).
- [3] <http://www.theguardian.com/film/2012/mar/26/mariana-trench-james-cameron-mission>
- [4] C. Kato, L. Li, Y. Nakamura, Y. Nogi, J. Tamaoka, K. Horikoshi: *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 1510 (1998).
- [5] http://www.jamstec.go.jp/j/about/press_release/20120816/
- [6] H. Kobayashi, Y. Hatada, T. Tsubouchi, T. Nagahama, H. Takami: *PLOS ONE*, DOI: 10.1371/journal.pone.0042727 (2012).
- [7] 重松亨, 西海理之 監修: 進化する食品高压加工技術, (エス・ティー・エス, 東京, 2013).
- [8] J.L. Markley, D.B. Northrop, C.A. Royer, eds.:

in High Pressure Effects in Molecular Biophysics and Enzymology, (Oxford University Press, New York, 1996).

- [9] 加藤千明, 柳林美樹, 稲田哲哉, 平清, 菊間敏雄, 鈴木欣三郎, 掘越弘毅: 高压生物学と高压技術, 鈴木敦士, 林力丸 監修, (さんえい出版, 1997), pp. 15-22.
- [10] E.F. DeLong, A.A. Yeyanos: *Science*, **228**, 1101 (1985).
- [11] D.H. Bartlett, M. Wright, A.A. Yeyanos, M. Silverman: *Nature*, **342**, 572 (1989).
- [12] C. Kato: in *Extremophiles Handbook*, eds. K. Horikoshi, G. Antranikian, A. Bull, F. Robb, K. Stetter (Springer-Verlag, Tokyo, 2011) 5.2, pp. 657-668.
- [13] C. Kato, T. Sato, M. Smorawinska, K. Horikoshi: *FEMS Microbiol. Lett.*, **122**, 91 (1994).
- [14] Y. Nogi, C. Kato, K. Horikoshi: *Arch. Microbiol.*, **170**, 331 (1998).
- [15] K. Nakasone, A. Ikegami, H. Kawano, R. Usami, C. Kato, K. Horikoshi: *Extremophiles*, **6**, 89 (2002).
- [16] C. Kato, T. Sato, F. Abe, E. Ohmae, H. Tamegai, K. Nakasone, K.S. Siddiqui, T. Thomas: in *Protein Adaptation in Extremophiles*, eds. T. Thomas, K.S. Siddiqui, (Nova Science Publisher, New York, 2008), pp. 167-191.
- [17] Y. Hamajima, T. Nagae, N. Watanabe, E. Ohmae, Y. Kato-Yamada, C. Kato: *Extremophiles*, **20**, 177 (2016).
- [18] F. Abe, C. Kato: in *Extremophiles in Deep-Sea Environments*, eds. K. Horikoshi, K. Tsujii, (Springer-Verlag, Tokyo, 1999), pp. 227-248.

[2017年1月14日受付, 2017年1月23日受理]

© 2017 日本高圧力学会