ISSN 2186-9936

Mar. 2020

極限環境生物学会誌

第18巻合併号

Journal of Japanese Society for Extremophiles

目次

巻頭言・・・ 2

原著論文・・ 4

ミニレビュー・・ 12

研究奨励賞受賞研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 55

学会開催報告・・ 68

学会誌投稿規定・執筆要領・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 71

会則・細則・・ 72

運営体制・・・ 75

巻　頭

Deinococcus 研究事始め

東洋大学生命科学部　鳴海 一成

私が放射線抵抗性細菌 *Deinococcus* の DNA 修復機構の研究を始めたのは、日本原子力研究所のポスドクの時からで、かれこれ 26 年が経つ。*Deinococcus* は DNA 二本鎖切断損傷の修復能力が著しく高いという特徴があるので、最初に解析すべき遺伝子として、DNA の切断点同士を連結して修復する働きを持つ DNA リガーゼの遺伝子をターゲットにした。他の微生物由来の DNA リガーゼ遺伝子の配列情報を基に配列の類似性が高い領域のプライマーを設計した。次に、*Deinococcus* の野生株ゲノムライブラリーを作製し、大腸菌コロニーハイブリダイゼーションで、DNA リガーゼ遺伝子をクローニングしようとしたのである。ところが、実験で選別できたクローンは DNA リガーゼ遺伝子ではなく、DNA リガーゼと同様に NAD を補酵素として用いる乳酸脱水素酵素（LDH）の遺伝子であった。折角 LDH 遺伝子をクローニングしたので、*Deinococcus* と進化的に近縁関係にある高度好熱菌 *Thermus* の LDH 遺伝子と配列を比較してみた。好冷菌から高度好熱菌まで存在する *Bacillus* 属あるいはその近縁種については、相同タンパク質のアミノ酸比較による耐熱性機構の解析が盛んに行われていたが、これらの菌は生育温度に依存して GC 含量が高くなる傾向があり、それがコドン使用頻度にバイアスをもたらす。一方、*Deinococcus* と *Thermus* のゲノムの GC 含量は共に 70%程度であることから、コドン使用頻度のバイアスを気にせず、耐熱性に関与するアミノ酸残基を推定することができるという論旨で論文を 1 報発表した。日本農芸化学会年会のトピックス集にも掲載され、新聞記事として取り上げられるなど、棚からぼた餅の出来事であった。

次に遺伝子解析のターゲットにしたのは、カタラーゼの遺伝子であった。カタラーゼは放射線照射で生じた活性酸素種のひとつである過酸化水素を水と酸素に分解する酵素であり、*Deinococcus* は通常の細菌よりも高いカタラーゼ活性を持つことが知られていた。二次元電気泳動解析の結果から、*Deinococcus* のカタラーゼのアミノ末端から数残基のアミノ酸配列が決定されていたので、この情報から推定される DNA 配列のオリゴヌクレオチドプライマーを設計し、ハイブリダイズするクローンを探索した。この実験は、バングラデシュの Savar 原子力研究所から派遣されてきた Mamun Hossain さんに協力してもらった。最終的には、*Deinococcus* のカタラーゼ遺伝子を持つクローンを見つけることが出来たのだが、そのクローンはプローブとのハイブリダイズシグナルを持つクローンを選別する途中で、Hossain さんがはずれと思い込んで廃棄袋に捨てたシャーレの中から奇跡的に救出したものであった。このときにクローニングしたカタラーゼ遺伝子のプロモーターは *Deinococcus* で強力な活性を持っており、現在でもマーカー遺伝子の発現に重宝している。

Edinburgh 大学の Bevan Moseley 教授が分離した *Deinococcus* のマイトマイシン C 感受性変異株 302 株と 262 株をマイトマイシン C 耐性に復帰させることのできるコスミドクローンを見つけたので、次に、この DNA 断片から変異株の感受性形質を相補する DNA 領域を同定することにした。この実験は、タイの Mahidol 大学から派遣されてきた Korbkit Cherdchu さんに協力してもらった。その結果、302 株ではヌクレオチド除去修復経路で働く *uvrA* 遺伝

子のスタートコドン付近の 144 塩基対が欠失していることが判明した。また、262 株では *uvrA* 遺伝子の中央部 2,230 番目のヌクレオチドの後に 1,322 塩基対の可動性遺伝因子（IS*2621* と命名）が挿入されていることが判明した。米国ユニフォームドサービス大学の Kenneth Minton 教授のグループも、Moseley 教授から分与された 302 株と 262 株を解析して *uvrA* 遺伝子を同定していた。しかし、我々の解析では Minton 教授のグループが解析できていなかった変異部位を正確に同定していたこと、*Deinococcus* から初めて可動性遺伝因子を発見したこと、*uvrA* 遺伝子から作られる UvrA タンパク質で保存されているアミノ酸配列の中から UvrA の機能に重要なアミノ酸を指摘していたことなどの新規性が認められ、Minton 教授のグループの論文発表から半年遅れで論文として発表することが出来た。Cherdchu さんが老眼のため、エタノールで塩析した微量の DNA の塊が見えないというので、塩析の際にブルーデキストランを加えるという工夫で切り抜けたことを記憶している。

次に、*Deinococcus* の放射線感受性変異株 KR4128 の放射線感受性を元どおり野生株レベルの放射線耐性に復帰させることの出来る DNA 領域の絞り込み実験を行った。その結果同定されたのは相同組換え修復で働く *recN* 遺伝子であった。変異株では *recN* 遺伝子の 1498 番目のヌクレオチドの 1 塩基置換でナンセンス変異が生じていた。この遺伝子の機能解析には、独自に考案した *Deinococcus* 遺伝子破壊株作製方法を初めて適用してみた。遺伝子を破壊するためには、他の微生物由来の抗生物質耐性遺伝子を発現させるのに、*Deinococcus* で機能するプロモーター配列を遺伝子の上流に配置する必要があった。このプロモーター配列として上述のカタラーゼ遺伝子プロモーターを利用したのである。予想通り、大腸菌由来のクロラムフェニコール不活化酵素遺伝子の上流に *Deinococcus* のカタラーゼ遺伝子プロモーターを配置することで、大腸菌由来のマーカー遺伝子を *Deinococcus* で発現させることが出来る様になった。1999 年のことである。現在では、*Deinococcus* の遺伝子操作で使用できる抗生物質がクロラムフェニコールの他に、カナマイシン、ストレプトマイシン、ハイグロマイシン、テトラサイクリンの計 5 種類となり、多重遺伝子破壊株を作出することが出来るようになっている。

2013 年 4 月、私は群馬県板倉町にある東洋大学生命科学部に移り、現在でも放射線抵抗性細菌の研究を継続している。*Deinococcus radiodurans* の他に、ナポリの温泉から分離された *Deinococcus geothermalis*、東京の水産試験場から分離された *Deinococcus grandis* も研究対象に加えて、DNA 修復関連遺伝子群の機能解析を中心に研究を行っている。また、大学院時代の研究テーマであった進化工学の手法を用いて、放射線抵抗性細菌の放射線耐性を増強する試みも行っている。私の研究室は「放射線微生物学研究室」と言い、おそらく世界中の大学を探してもこの名前の研究室はどこにもないであろう。東洋大学生命科学部には、極限環境微生物を研究している教員が私を含めて 6 名おり、それぞれ研究室を主宰している。いわば極限環境微生物研究の世界的メッカである。東洋大学生命科学部が開設されたのは、1997 年 4 月であり、当時私は日本原子力研究所のポスドクからパーマネントの研究員に採用されて 2 年目に入る年であった。当時の研究室長から、東洋大学生命科学部開設記念の催しの招待状があるから、代わりに行ってもらえないだろうかと言われ、東洋大学板倉キャンパスまで出かけて行った。生命科学部の初代学部長は、極限環境微生物学会の名誉会長である堀越弘毅先生であった。堀越先生にお会いして、私が放射線抵抗性細菌から放射線耐性に関わる新しい遺伝子を発見したことを話したところ、堀越先生の学部長挨拶の際に、私の話をアドリブで紹介してもらったことを今でも記憶している。それから 22 年後、まさか私が東洋大学生命科学部の学部長になるとは思ってもみなかったことである。

ORIGINAL PAPER

Okuda K[*,1)], Ito K[*,1)], Hagiwara Y[1,2)],
Okeda T[1)], Yatsunami R[1)], Fukui T[1)] and Nakamura S[1)]

Characterization of novel arabinofuranosidases from *Paenibacillus* sp. strain H2C

[1)] School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, Yokohama, Japan
[2)] Process Development Laboratory, Research Institute for Bioscience Products & Fine Chemicals, Ajinomoto Co., Inc., Kawasaki, Japan

*Equal contribution
Corresponding author: Satoshi Nakamura, snakamur@bio.titech.ac.jp
Phone: +81-45-924-5765; Fax: +81-45-924-5837

Received: January 15, 2020/ **Revised:** February 2, 2020; February 4, 2020 / **Accepted:** February 4, 2020

Abstract

Genes encoding novel glycoside hydrolase (GH) families 43 and 51 arabinofuranosidases, Abf43A and Abf51A respectively, were found on the genome of Paenibacillus sp. H2C. Abf43A and Abf51A were expressed in Escherichia coli, purified and characterized. Abf43A was highly active toward both polysaccharides and short chain substrates, whereas Abf51A was highly active toward only short chain substrates. The optimum conditions of Abf43A is pH 4.5-6.5 and 45-60°C, suggesting that Abf43A would be an acidophilic and thermo-active enzyme. On the other hand, Abf51A has optimum for pH 6.5-7.5 and 37-50°C. Analyses of cleavage specificity revealed that Abf43A belongs to the group AXH-m2,3 and Abf51A belongs to AXH-m,d2,3. Compared to Abf51A, Abf43A was highly synergistic with a GH11 xylanase in arabinoxylan degradation.

Key words: arabinofuranosidase, xylanase, arabinoxylan degradation, thermo-active enzyme, acidophilic enzyme

Introduction

Plant cell walls consist of cellulose, hemicellulose and lignin2). The major plant hemicellulose is xylan, which has a backbone consisting of β-1,4-linked D-xylopyranosyl (Xylp) residues. Arabinoxylan has the xylan backbone substituted by arabinofuranose (Araf) residues with α-1,2 and/or α-1,3 bonds, and further substituted by 4-O-methyglucuronic acid (MeGlcA) residues, acetyl groups and others[2,6-8,10,12,21,23,25)]. Arabinoxylan shows resistance to enzymatic hydrolysis due to its complex structure, and it can be degraded efficiently when the enzymes that degrade the main chain and that degrade the side chain are used simultaneously[27)].

Xylanases are the enzymes which hydrolyze β-1,4-linkage of the xylan backbone. Xylanases of glycoside hydrolase (GH) families 10 and 11 are known as the major xylanases, and both xylanases are different in substrate specificity. GH10 xylanase, having a shallow cleft which accommodates the side chains of substrates without causing steric hindrance, can cleave β-1,4 linkages close to Araf and MeGlcA substituents and produce shorter oligosaccharides than those produced by GH11 xylanase. In contrast, GH11 xylanase has a deep cleft and its activity is hindered by the side chains of substrates[2,3,11,15)].

Arabinofuranosidases are the enzymes which release Araf residues from arabinoxylan, and are classified in GH families 43, 51, 54 and 622,4,[18)]. The cleavage specificity of arabinofuranosidases can be classified into the next three groups: arabinofuranosidases that can only cleave Araf from singly substituted Xylp (AXH-m); arabinofuranosidases that can cleave one Araf from doubly substituted Xylp (AXH-d); and arabinofuranosidases that can cleave singly substituted and doubly substituted terminal Xylp but not act on doubly substituted internal Xylp (AXH-m,d). The additional numbers often indicate the linkage of arabinose to be cleaved. For example, AXH-d3 shows the arabinofuranosidase that can cleave an Araf residue linked by the α-1,3 bond from doubly substituted Xylp[4,13,17,18)].

Paenibacillus sp. strain H2C was isolated from an e nrichment culture using corn arabinoxylan as the sole carbon source[9]. The 16S rRNA sequence analysis of strain H2C revealed that its most closely related type strains are *Paenibacillus ginsengiterrae* (99.0% identity) and P. cellulosilyticus (98.4% identity). GH5, GH10, GH11 and GH30 xylanases (Xyn5A, Xyn10B, Xyn11A and Xyn30A, respectively) are found from the culture supernatant of strain H2C. Genome analysis of strain H2C9) identified putative genes encoding GH43 and GH51 arabinofuranosidases, Abf43A and Abf51A, respectively. In this study, we characterized the two novel arabinofuranosidases, Abf43A and Abf51A. The combinational effects of Abf43A or Abf51A with Xyn11A on degradation of arabinoxylans are also investigated.

Materials and methods

Materials

Oligonucleotide primers were purchased from Hokkaido System Science (Sapporo, Japan). Restriction enzymes and KOD DNA polymerase were obtained from Toyobo (Osaka, Japan), and In-Fusion HD Cloning Kit and DNA Ligation kit were obtained from Takara Bio (Kusatsu, Japan). Wheat arabinoxylan (insoluble) (WAX), rye arabinoxylan (RAX) and arabinan were purchased from Megazyme (Brey, Ireland). Arabinoxylooligosaccharides (AXOS) such as 3^2-α-L-arabinofuranosyl-xylobiose (A^3X), 2^3-α-L-arabinofuranosyl-xylotriose (A^2XX), 2^3,3^3-di-α-L-arabinofuranosyl-xylotriose ($A^{2+3}XX$), 3^3-α-L-arabinofuranosyl-xylotetraose (XA^3XX) and a mixture of XA^3XX and 2^3-α-L-arabinofuranosyl-xylotetraose (XA^2XX) were also purchased from Megazyme. *p*-Nitrophenyl-arabinofuranoside (*p*NPA) and *p*-nitrophenyl-xylopyranoside (*p*NPX) were obtained from Sigma-Aldrich Japan (Tokyo, Japan).

Preparation of recombinant enzymes

InterPro[20], dbCAN[28], and CAZy (http://www.cazy.org) databases were used for determination of the conserved domains of Abf43A and Abf51A, and SignalP 4.1 algorithm (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP) was used to identify potential N-terminal signal peptides. The structural genes encoding Abf43A and Abf51A were amplified by PCR using genomic DNA as the template, and then cloned into the NdeI/XhoI site of pET-21b(+) vector (Novagen, Madison, WI) to construct pET-spAbf43A and pET-Abf51A, respectively. In order to remove the signal peptide region, inverse PCR was performed using pET-spAbf43A as a template to construct pET-Abf43A. Both pET-Abf43A and pET-Abf51A contain C-terminal His-tag derived from the vector. Sequences of the primers used are: 5'-AAGGAGATATACATATGTTTAAGAAATTGAG-TTC-3' (forward), 5'-GGTGGTGGTGCTCGAGGGTG-ATTCCAAATAATCGG-3' (reverse) for construction of pET-spAbf43A; 5'-AAGGAGATATACATATGGCAA-CGAAGCCTACTGC-3' (forward), 5'-GGTGGTGG-TGCTCGAGAGCTTTCAGTGCGAGCGATG-3' (rverse) for construction of pET-Abf51A; 5'-GCTAACAGCTC-TATTGCG-3' (forward) and 5'-CATATGTATATCTC-CTCCTTAAAG-3' (reverse) for construction of pET-Abf43A.

Escherichia coli BL21(DE3) cells (Novagen) containing pET-Abf43AM or pET-Abf51A were cultured at 37°C in Luria-Bertani (LB) medium[24] containing 50 μg/mL of ampicillin until OD_{660} reached 0.4-0.6. Then, 0.1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) was added to induce gene expression, and incubated at 18°C for 18 h with shaking. The cells were harvested by centrifugation (7,000 x g, 4°C, 10 min), suspended in 50 mM Britton-Robinson (BR) buffer (pH 6.5)[5], and disrupted by sonication. After centrifugation, the supernatant (cell-free extract) was applied on a Ni Sepharose 6 Fast Flow column (GE Healthcare, Chicago, IL). The column was washed with 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 500 mM NaCl and 25 mM imidazole, and eluted using the same buffer containing 500 mM imidazole. Eluted fractions were pooled and dialyzed against 50 mM BR buffer (pH 6.5). Protein purity was assessed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)[14], and protein concentration was determined by the Lowry method[16] using bovine serum albumin as a standard. Recombinant Xyn11A was prepared as described previously[9].

DNA sequencing

DNA sequences were determined using an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Waltham, MA). For sequencing reactions, a BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) was used. Sequence data were analyzed with GENETYX-MAC ver.16.0.0 (Genetyx, Tokyo, Japan).

Accession numbers

The nucleotide sequences of arabinofuranosidase genes have been deposited in DDBJ/EMBL/Genbank with the following accession numbers: Abf43A, LC520056; and Abf51A, LC520057.

Enzyme assay

Activity measurements were performed using long chain polysaccharide substrates (RAX, WAX and arabinan) and *p*-nitrophenylated short chain substrates (*p*NPA and *p*NPX). The activities toward polysaccharides were determined by the 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) assay[19] using xylose as a standard. Each reaction mixture contained 1.2% polysaccharide and enzyme solution in 50 mM BR buffer (pH 6.5). Reaction was carried out at 37°C for 10 min. One unit was defined as the amount of enzyme that produces 1 μmol of reducing sugars equivalent per min under the conditions described above. The activities toward *p*NPA and *p*NPX were assessed by measuring absorbance at 405 nm. Each reaction mixture contained 0.4% *p*NPA or *p*NPX and enzyme solution in 50 mM BR buffer (pH 6.5). Reaction was carried out at 37°C for 10 min, and then stopped by adding 667 mM Na_2CO_3. One unit was defined as the amount of enzyme that produces 1 μmol of *p*NP equivalent per min under the conditions described above.

Cleavage specificity

Each reaction mixture contained 0.08% AXOS and 0.43 nmol/mL of an enzyme in 50 mM BR buffer (pH 6.5). Reaction was carried out at pH 6.5, 37°C for 2 h. Aliquots of reaction mixtures were applied to a thin layer chromatography (TLC) plate (Silica gel 60 F_{254}, Merck, Millipore, Billerica, MA). TLC was carried out with a solvent of chloroform-acetic acid-water (3:6:1) as a developing solvent. Sugars were detected by heating the plate after soaking with a mixture of 6.5 mM *N*-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride, 3% sulfuric acid and methanol.

Assessment of combinatorial effect with xylanase

For assessment of combinatorial effects with xylanase, 8.33 μg/mL of Abf43A or Abf51A and/or 1.67 μg/mL of Xyn11A were incubated with 1.0% RAX or WAX in 50 mM BR buffer (pH 6.5). Reactions were carried out at 37°C for 24 h. After stopping the reaction by boiling, the amount of reducing sugar was measured by the DNS method[19].

Results and Discussion

Domain structures

Abf43A is predicted to be a multi-domain enzyme composed of a GH43 catalytic domain and a carbohydrate binding module (CBM) family 6 carbohydrate binding domain (Fig. 1). On the other hand, Abf51A is a single-domain enzyme composed of a GH51 catalytic domain. Abf43A has an N-terminal signal peptide, but Abf51A has no signal peptide, indicating the difference of cellular locations and thus physiological roles of Abf43A and Abf51A.

Fig. 1 Domain structures of Abf43A and Abf51A from strain H2C.
GH43, GH43 catalytic domain; GH51, GH51 catalytic domain; CBM6: CBM6 carbohydrate binding domain.

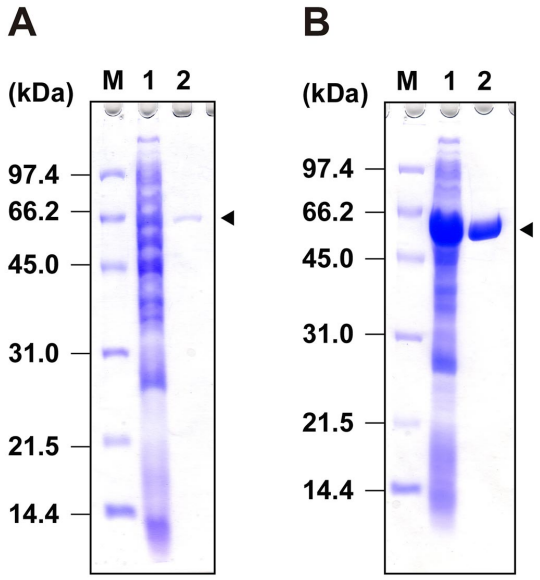


Fig. 2 SDS-PAGE of cell-free extracts and purified enzymes of Abf43A (A) and Abf51A (B).
Lanes M, molecular mass markers; lanes 1, cell-free extract; lanes 2, purified enzyme.

Cloning, expression and purification of recombinant enzymes

Expression plasmids encoding C-terminally His-tagged mature Abf43A and Abf51A were constructed and transformed into *E. coli* BL21(DE3). Both enzymes were successfully expressed in the cell-free extracts of *E. coli*, and were purified by affinity chromatography using a Ni chelate column. Each purified enzyme showed a single band on SDS-PAGE (Fig. 2).

Substrate specificity

The activities of Abf43A and Abf51A toward RAX, WAX, arabinan, *p*NPA and *p*NPX were determined.

Abf43A showed high activity toward RAX and WAX, while Abf51A showed little or no activity (Table 1). Meanwhile, Abf51A showed higher activity toward *p*NPA than that of Abf43A. From these results, it was suggested that Abf43A would act on both polysaccharides and short chain substrates like *p*NPA, whereas Abf51A would specifically act on short chain substrates. These facts are consistent with the previously reported characteristics of GH43 and GH51 arabinofuranosidases[2)]. Comparing the activity toward arabinan, Abf51A showed much higher activity than Abf43A. Arabinan has the backbone consisting of α-1,5-linked Ara*f* residues, and these can be branched by α-1,3-linked Ara*f* residues. Therefore, Abf51A can cleave the substrate of which backbone is constituted by Ara*f*. Both Abf43A and Abf51A did not react with *p*NPX, suggesting both enzymes have no xylosidase activity.

Table 1 Activities of Abf43A and Abf51A toward various substrates.

Substrate	Enzyme (U/μmol)	
	Abf43A	Abf51A
RAX	1,790 ± 81	Trace
WAX	42.5 ± 0.5	N.D.
Arabinan	6.69 ± 0.07	344 ± 6
pNPA	632 ± 29	4,490 ± 60
pNPX	Trace	N.D.

Trace, slightly active after overnight reaction; N.D., Not detected.

Effects of pH and temperature on activity

The effect of reaction pH on activity was determined at pH 2.5-10.5 in 50 mM BR buffer at 37°C. The effect of reaction temperature on activity was determined at 20-80°C in 50 mM BR buffer (pH 6.5).

pH and temperature dependencies on activity of Abf43A toward RAX are shown in Fig. 3. Abf43A showed the highest activity (more than 80%) at pH 4.5-6.5 and 45-60°C, indicating that Abf43A would be an acidophilic and thermo-active enzyme. The extremophilic characteristics of Abf43A are desirable for industrial applications.

pH and temperature dependences on activity of Abf51A toward *p*NPA are shown in Fig. 4. Abf51A showed the highest activity at pH 6.5-7.5 and 37-50°C. Abf51A is a cytoplasmic enzyme and the optimum pH and temperature of this enzyme may reflect the physiological conditions in strain H2C.

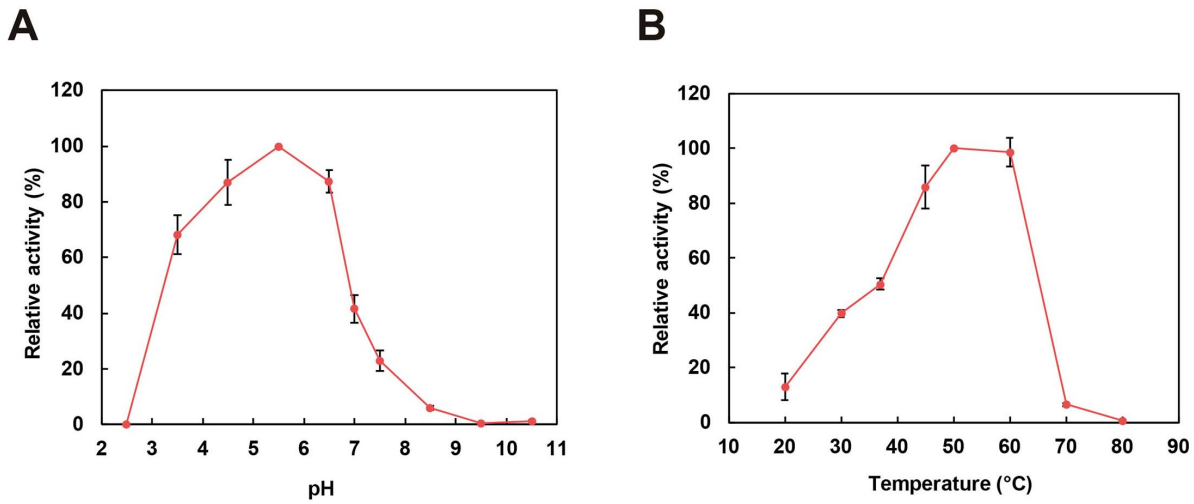


Fig. 3 Effects of pH (A) and temperature (B) on activity of Abf43A toward RAX.
Activity was measured using 1.2% RAX as a substrate. Reaction was carried out at pH 2.5-10.5 and 37°C for 10 min (A), and at pH 6.5 and 20-80°C for 10 min (B).

Mode of action

α-L-Arabinofuranosidases can be divided into three groups according to the cleavage specificity[18]. In order to determine the group of cleavage specificity, several kinds of AXOS were assayed as a substrate for Abf43A and Abf51A, and reaction products were analyzed by TLC.

As shown in Fig. 5, Abf43A cleaved singly substituted AXOSs such as A^3X, A^2XX, XA^2XX and XA^3XX, but did not cleave a doubly substituted AXOS, $A^{2+3}XX$. This result suggested that Abf43A could cleave only singly substituted Ara*f* residue of which linkage is α-1,2 or α-1,3, indicating that Abf43A would belong to AXH-m2,3. On the other hand, Abf51A cleaved both singly and doubly substituted Ara*f* residues, indicating that Abf51A is a member of AXH-m,d2,3. The differences in cleavage specificity between Abf43A and Abf51A may contribute to efficient degradation of arabinoxylan by strain H2C.

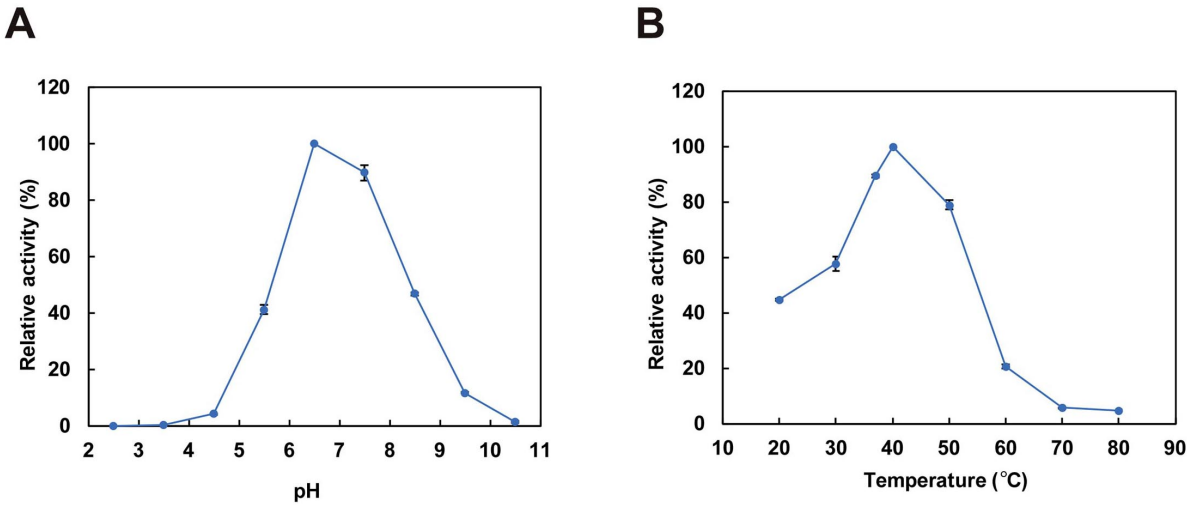


Fig. 4 Effects of pH (A) and temperature (B) on activity of Abf51A toward pNPA.
Activity was measured using 0.4% pNPA as a substrate. Reaction was carried out at pH 2.5-10.5 and 37°C for 10 min (A), and at pH 6.5 and 20-80°C for 10 min (B).

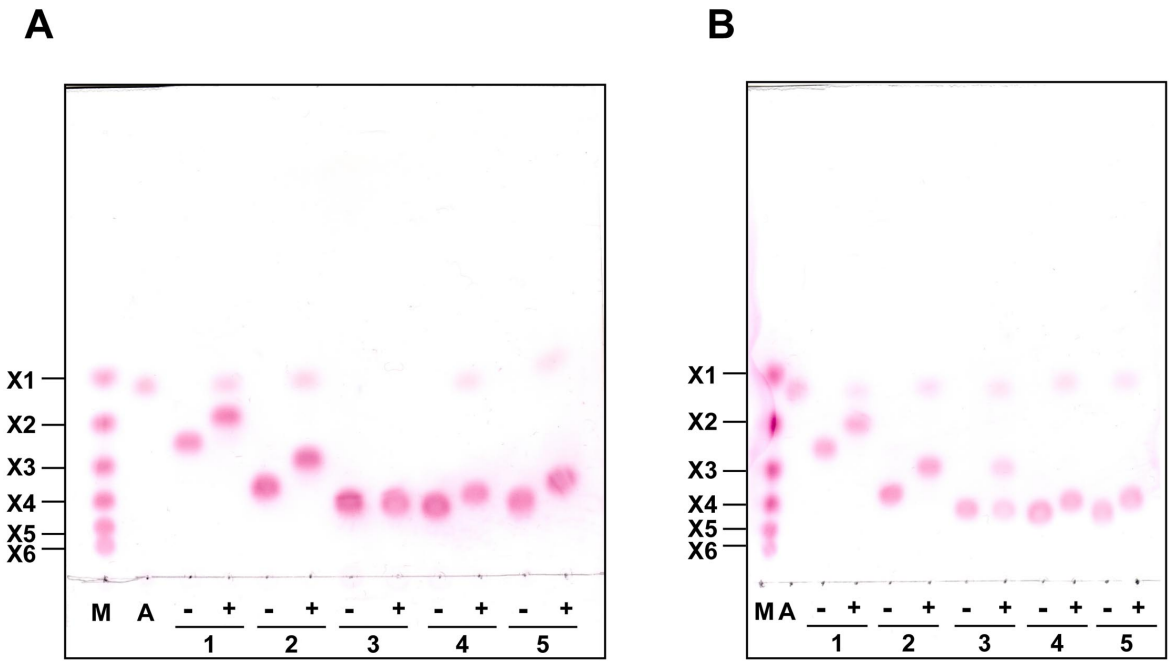


Fig. 5 TLC of AXOS hydrolysates by Abf43A (A) and Abf51A (B).
M, standard markers of xylose (X1) to xylohexaose (X6); A, Arabinose; -, without enzyme; + with enzyme; 1, A^3X; 2, A^2XX; 3, $A^{2+3}XX$; 4, XA^3XX; 5, XA^3XX/XA^2XX.

Table 2 Combinatorial effects of Abf43A or Abf51A with Xyn11A on hydrolysis of RAX and WAX.

Enzyme(s)	RAX		WAX	
	Reducing sugar (mg/mL)	Synergy* (%)	Reducing sugar (mg/mL)	Synergy* (%)
Xyn11A	2.52 ± 0.19	-	1.24 ± 0.07	-
Abf43A	1.03 ± 0.03	-	0.0870 ± 0.0066	-
Abf51A	0.0259 ± 0.0021	-	0.00608 ± 0.00057	-
Xyn11A + Abf43A	4.77 ± 0.37	34.7	1.92 ± 0.01	45.1
Xyn11A + Abf51A	2.71 ± 0.29	6.39	1.33 ± 0.05	7.21

*The synergy was defined as the ratio of the amount of reducing sugars generated when enzymes were used simultaneously to the sum of the amount of reducing sugars generated by each enzyme was used alone.

Synergistic effect with xylanase

The combinatorial effect of Abf43A or Abf51A with Xyn11A on hydrolysis of RAX and WAX were investigated by comparing the amount of reducing sugars generated.

When Xyn11A and Abf43A were reacted alone to RAX, the amounts of reducing sugars generated were 2.52 mg/mL and 1.03 mg/mL, respectively. The mixture of Xyn11A and Abf43A released higher amount of reducing sugars (4.77 mg / mL; synergy value of 34.4%). Likewise, a synergy value of 45.1% was obtained when Xyn11A and Abf43A were simultaneously added to WAX substrate. GH11 xylanases do not prefer substituted xylans[15], so it is considered that Xyn11A can degrade only a part of the main chain of arabinoxylans. On the other hand, Abf43A has activity toward long-chain and short-chain substrates. Abf43A can remove the arabinose side chains from arabinoxylans effectively, correspondingly increasing the ratio of Xyn11A-hydrolyzable glycosidic bonds in the main chain of arabinoxylans. Therefore, a large synergistic effect was observed when adding Xyn11A and Abf43A simultaneously. A similar observation has been reported for GH43 arabinofuranosidase Abf43A and GH10 xylanase XynBE18 from *Paenibacillus* sp. strain E18[26].

When Abf51A was reacted alone to RAX, the amount of reducing sugars generated was 0.0021 mg/mL. The mixture of Abf51A and Xyn11A released reducing sugars of 2.71 mg/mL (synergy value of 6.39%), which was not so much compared to the sum of reducing sugars released by each enzyme alone. A similar tendency was observed when WAX was used as the substrate.

Abf51A shows activity only toward short-chain substrates, so Abf51A alone can hardly act on long-chain arabinoxylans. When Abf51A was simultaneously added with Xyn11A, it became possible to act on oligosaccharides generated by Xyn11A. Since it would be assumed that Xyn11A degraded arabinoxylans to a limited extent, the synergistic effect of Abf51A and Xyn11A was restrictive. To our knowledge, there are no reports on the synergistic effect of GH51 arabinofuranosidases and xylanases.

Acknowledgements

The authors thank the Biomaterials Analysis Division, Tokyo Institute of Technology for DNA sequencing.

References

1) Bacic, A., and Stone, B. A. 1980. A (1→3)- and (1→4)-linked β-D-glucan in the endosperm cell-walls of wheat. Carbohydr. Res. 82: 372-377.
2) Biely, P., Singh, S., and Puchart, V. 2016. Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art. Biotechnol. Adv. 34: 1260-1274.
3) Biely, P., Vršanská, M., Tenkanen, M., and Kluepfel, D. 1997. Endo-β-1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. J. Biotechnol. 57: 151-166.
4) Borsenberger, V., Dornez, E., Desrousseaux, M., Massou, S., Tenkanen, M., Courtin, C. M., Dumon, C., O'Donohue, M. J., and Fauré, R. 2014. A ^{1}H NMR study of the specificity of α-L-arabinofuranosidases on natural and unnatural substrates. Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj. 1840: 3106-3114.
5) Britton, H. T. S., and Robinson, R. A. 1931.

Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal. J. Chem. Soc. 1931: 1456-1462.

6) Ebringerová, A., and Heinze, T. 2000. Xylan and xylan derivatives-biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. Macromol. Rapid Commun. 21: 542-556.

7) Fincher, G. B., and Stone, B. A. 1986. Cell walls and their components in cereal grain technology. Adv. Cereal Sci. Technol. 8: 207-295.

8) Gruppen, H., Kormelink, F. J. M., and Voragen, A. G. J. 1993. Water-unextractable cell wall material from wheat flour. 3. A structural model for arabinoxylans. J. Cereal Sci. 18: 111-128.

9) Hagiwara, Y., Mihara, Y., Sakagami, K., Sagara, R., Bat-Erdene, U., Yatsunami, R., and Nakamura, S. 2020. Isolation of four xylanases capable of hydrolyzing corn fiber xylan from *Paenibacillus* sp. H2C. Biosci. Biotechnol. Biochem. 84: 640-650.

10) Izydorczyk, M., and Biliaderis, C. G. 1994. Studies on the structure of wheat-endosperm arabinoxylans. Carbohydr. Polym. 24: 61-71.

11) Kormelink, F. J. M., and Voragen, A. G. J. 1993. Degradation of different [(glucurono)arabino]xylans by a combination of purified xylan-degrading enzymes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38: 688–695.

12) Koutaniemi, S., Guillon, F., Tranquet, O., Bouchet, B., Tuomainen, P., Virkki, L., Petersen, H. L., Willats, W. G., Saulnier, L., and Tenkanen, M. 2012. Substituent-specific antibody against glucuronoxylan reveals close association of glucuronic acid and acetyl substituents and distinct labeling patterns in tree species. Planta. 236: 739-751.

13) Koutaniemi, S., and Tenkanen, M. 2016. Action of three GH51 and one GH54 α-arabinofuranosidases on internally and terminally located arabinofuranosyl branches. J. Biotechnol. 229: 22-30.

14) Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

15) Linares-Pasten, J. A., Aronsson, A., and Karlsson, E. N. 2018. Structural considerations on the use of endo-xylanases for the production of prebiotic xylooligosaccharides from biomass. Curr. Protein Pept. Sci. 19: 48-67.

16) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

17) McCleary, B. V., Sloane, N., and Draga, A. 2015. Determination of total dietary fibre and available carbohydrates: A rapid integrated procedure that simulates in vivo digestion. Starch, 67: 860-883.

18) Mechelke, M., Koeck, D. E., Broeker, J., Roessler, B., Krabichler, F., Schwarz, W. H., Zverlov, V. V., and Liebl, W. 2017. Characterization of the arabinoxylan-degrading machinery of the thermophilic bacterium *Herbinix hemicellulosilytica*-Six new xylanases, three arabinofuranosidases and one xylosidase. J. Biotechnol. 257: 122-130.

19) Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31: 426-428.

20) Mitchell, A., Chang, H. Y., Daugherty, L., Fraser, M., Hunter, S., Lopez, R., McAnulla, C., McMenamin, C., Nuka, G., Pesseat, S., Sangrador-Vegas, A., Scheremetjew, M., Rato, C., Yong, S. Y., Bateman, A., Punta, M., Attwood, T. K., Sigrist, C. J. A., Redaschi, N., Rivoire, C., Xenarios, I., Kahn, D., Guyot, D., Bork, P., Letunic, I., Gough, J., Oates, M., Haft, D., Huang, H., Natale, D. A., Wu, C. H., Orengo, C., Sillitoe, I., Mi, H., Thomas, P. D., and Finn, R. D. 2015. The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years. Nucleic Acids Res. 43: D213-D221.

21) Ordaz-Ortiz, J. J., and Saulnier, L. 2005. Structural variability of arabinoxylans from wheat flour. Comparison of water-extractable and xylanase-extractable arabinoxylans. J. Cereal Sci. 42: 119-125.

22) Pitkänen, A., Immonen, R. J., Gröhn, O. H., and Kharatishvili, I. 2009. From traumatic brain injury to posttraumatic epilepsy: What animal models tell us about the process and treatment

options. Epilepsia. 50 Suppl 2: 21–29.

23) Rhodes, D. I., Sadek, M., and Stone, B. A. 2002. Hydroxycinnamic acids in walls of wheat aleurone cells. J. Cereal Sci. 36: 67-81.

24) Sambrook, J., Fritsch, E. R., and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

25) Scheller, H. V., and Ulvskov, P. 2010. Hemicelluloses. Annu. Rev. Plant Biol. 61: 263-289.

26) Shi, P., Chen, X., Meng, K., Huang, H., Bai, Y., Luo, H., Yang, P., and Yao, B. 2013. Distinct Actions by Paenibacillus sp. Strain E18 α-l-Arabinofuranosidases and Xylanase in Xylan Degradation. Appl. Environ. Microbiol. 79: 1990-1995.

27) Sørensen, H. R., Jørgensen, C. T., Hansen, C. H., Jørgensen, C. I., Pedersen, S., and Meyer, A. S. 2006. A novel GH43 α-L-arabinofuranosidase from *Humicola insolens*: mode of action and synergy with GH51 α-L-arabinofuranosidases on wheat arabinoxylan. Appl. Microbiol. Biotechnol. 73: 850–861.

28) Yin, Y., Mao, X., Yang, J., Chen, X., Mao, F., and Xu, Y. 2012. A web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. Nucleic Acids Res. 40: 445-451.

MINI REVIEW

Fujishima K

Cysteine biosynthesis from serine using bioengineered cysteine-free enzymes

システインを含まない酵素によるシステイン生合成経路の再構成

東京工業大学地球生命研究所
藤島皓介

Earth-Life Science Institute, Tokyo Institute of Technology Ookayama, Meguro-ku Tokyo 152-8550 Japan.

Corresponding author: Kosuke Fujishima
Tel: 08021321196　Email:fuji@elsi.jp

Received: Mar. 13, 2019/ Revised: Apr. 22, 2019 Accepted: Apr. 23, 2019

Abstract　The order of amino acid addition to the genetic code is one of the unsolved questions regarding the origin of biological system. To achieve sustainable supply of amino acids, biosynthesis pathway plays an important role. However, enzymes are made with the amino acids they produce. To solve this chicken-and-egg problem, we focused on the cysteine biosynthesis pathway in Escherichia coli where serine is converted to O-acetylserine via serine acetyltransferase (CysE) and O-acetylserine to cysteine via O-acetylserine sulfhydrylase (CysK/CysM). We have bioengineered these enzymes and substituted all cysteine and methionine residues (two sulfur-containing proteinogenic amino acids) and tested their enzymatic activity both in vivo and in vitro. We found that both the cysteine-free CysE and CysM are capable to rescue E.coli knockout strains that lack cysE gene and cysE/cysK genes. Activities of the engineered CysE and CysM recombinant proteins were also confirmed in vitro. Together this research provides the first example of the reconstruction of complete amino acid synthesis pathway using enzymes that lacks the so-produced amino acids, providing new insight into the orders of biotic amino acids to the genetic code.

Keyword: システイン生合成、遺伝暗号表、アミノ酸の起源、合成生物学、遺伝子改変

はじめに

生命の起源，すなわち原始地球における非生物的且つ連続的な化学反応から，どのように現在の複雑な生命システムが進化したのかという大きな問題は，宇宙生物学分野における一大テーマである．その中でも，特に様々な化学反応の触媒として利用されているタンパク質の基本構成因子である 20 種類のアミノ酸のうち，約半数は隕石や彗星，あるいはユーリー・ミラーの実験に代表される地球上での無機物からの化学進化によって合成されうることが証明されている (Danger et al., 2012; Glavin et al., 2010; Higgs and Pudritz, 2009). 一方で，これらのアミノ酸を安定的に供給するための生合成経路は，現在の生化学ではタンパク質そのものが担っていることから，非生物的に合成が難しい新規のアミノ酸を合成するために必要なタンパク質は，そのアミノ酸を配列中に含まないことが予想される．つまり進化途上の生命は，その時点で遺伝暗号表にコードされている種類の限られたアミノ酸を合成して利用していた可能性が考えられている (Lu and Freeland, 2006). 現在アミノ酸の生合成経路に関わる酵素は通常 20 種類のアミノ酸を全て含んでいるが，トリプトファン，フェニルアラニン，チロシンといった芳香族や唯一チオール基を側鎖に持つシステインは生合成経路の発展とともに遺伝暗号表に後から加わったと考えられている．特にシステインにおいては，補酵素 A やメチオニンなど様々な代謝物質の硫黄源として利用されている他(Ferla and Patrick, 2014)，生体内の電子伝

達や酸化還元反応に関わる普遍的な鉄硫黄クラスタータンパク質において鉄元素と直接結合するアミノ酸であり(Beinert et al., 1997)，またタンパク質の高次構造を維持するためのジスルフィド結合を提供する重要なアミノ酸である(Sevier and Kaiser, 2002)．このように生命機能の様々な場面で利用される鍵分子にも関わらず，興味深いことに過去の様々な化学進化実験及び隕石等に含まれる有機物からはなぜかシステインは検出されていない(Parker et al., 2011b). そこで本稿では，システインはそれ自身を配列に含まないタンパク質酵素によって合成されうるという仮説を検証するために我々が行った改変遺伝子群によるシステインの生合成経路の再構築実験を紹介する(Fujishima et al., 2018). 具体的には大腸菌における既存のシステイン合成経路に関わる２種類のタンパク質配列を改変し, 最終生成物であるシステインを一切配列に含まない酵素で合成反応が進むかどうかの確認を行った. これまでにもアミノ酸の種類を限定させて作成した改変タンパク質の報告例はあるが(Reetz and Wu, 2008; Walter et al., 2005), アミノ酸生合成経路に関わる酵素に対して行なわれた例はない.

システイン生合成経路

現在，システインの生合成経路に関しては主に４つの経路が知られている．まず最も幅広い生物種で保存されているのが，植物やバクテリア，一部の古細菌において確認されているセリンから中間体を介して合成される経路である(Kitabatake et al., 2000)（図 1）.

例えば大腸菌内では CysE と呼ばれるセリンアセチルトランスフェラーゼがセリンをアセチル化して *O*-アセチルセリンを生じ，続いてスルフヒドリラーゼである CysM あるいは CysK が *O*-アセチルセリンを脱アセチル化し，硫化水素あるいはチオ硫酸を硫黄源として最終的にシステインを合成することが知られている.

一方で従属栄養微生物や一部の真核生物ではシステインはメチオニンからトランススルフレーション経路によってホモシステインを介して最終的にシステインを作っている(Morzycka and Paszewski, 1979). またメタン生成能を持つ古細菌の場合は，興味深い事に tRNA 上に一旦ホスホセリンとしてチャージされた後に，Sep-tRNA:Cys-tRNA synthase (SepCysS)と呼ばれる別の酵素がシステインに変換している．このシステイ

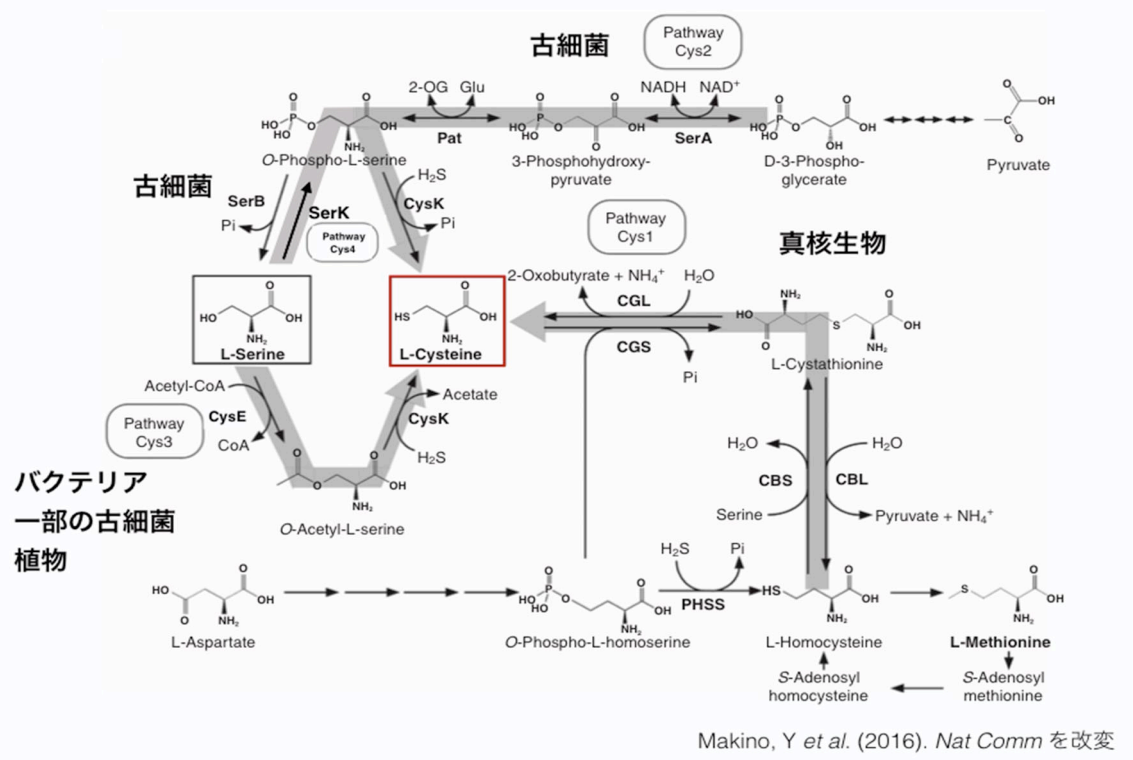


図 1. 生物界における４つの主要なシステイン生合成経路
システインを生化学的に合成にする主要な経路としてホモシステインからシスタチオニンを介して合成される経路（Pathway Cys1），ホスホグリセリン酸からホスホセリンを介して合成される経路（Pathway Cys2），セリンから *O*-アセチルセリンを介して合成される経路（Pathway Cys3）そしてセリンから Pathway Cys2 同様，ホスホセリンを介して合成される経路（Pathway Cys4）が挙げられる（Makino et al., 2016 の図 1 を一部改変）.

ンはそのままタンパク質の一部としてポリペプチドに取り込まれる事になる(Sauerwald et al., 2005). 近年，この２つの酵素を介したメカニズムはメタン古細菌だけでなく，幅広い未培養古細菌と一部のバクテリアにおいても発見されている. 興味深いことに 21 番目，22 番目のアミノ酸として知られているセレノシステインとピロリシンに関しても，それぞれ tRNA 上にアミノアシル化されたホスホセリンとリジンが酵素によって化学修飾を受けて合成されている(Yuan et al., 2010). また普遍的な 20 種類のアミノ酸の中でもグルタミンとアスパラギンに関しては同様の tRNA 依存的なアミノ酸の置換あるいは修飾によって合成されることが報告されている(Ibba et al., 2000). このような tRNA 依存的なアミノ酸合成は見方によっては新しい tRNA 合成酵素(ARS)を介さずにタンパク質に直接新しいアミノ酸を導入し，ポリペプチドの機能を広げるという意味で，生物が遺伝暗号表の拡張を試す良い戦略なのかもしれない. いずれにせよシステインの生合成に関しては複数の経路が存在し，そのいずれもがシステインを配列中に含む複数の酵素による反応に依存しているという鶏と卵の問題を抱えている.

システインを持たないシステイン合成酵素の作成

そこで我々は直接的なやり方でこの問題の一端を解決する方法を試みた. それはシステイン合成酵素の全てシステイン残基を置換するという手法である. 特に４つの生合成経路のうち最も幅広く保存されているセリン→*O*-アセチルセリン→システインという経路に注目し，その各ステップに関わるそれぞれの酵素である *cysE* と *cysM* 遺伝子配列を大腸菌から取得，システインをコードする領域をセリンに対応するように塩基置換した *cysE-C* と *cysM-C* 遺伝子(-C はシステインを含まないことを示す)を設計し，遺伝子の全長を委託合成した. システイン残基は CysE タンパク質で計 3 箇所，CysM タンパク質で計 2 箇所を置換した. また同様に硫黄元素を配列中に含まないタンパク質の合成にチャレンジするためにシステイン置換に加えて，さらに開始コドン以外のメチオニン残基を同じく疎水性アミノ酸であるロイシンあるいはイソロイシンに置換した *cysE-CM*

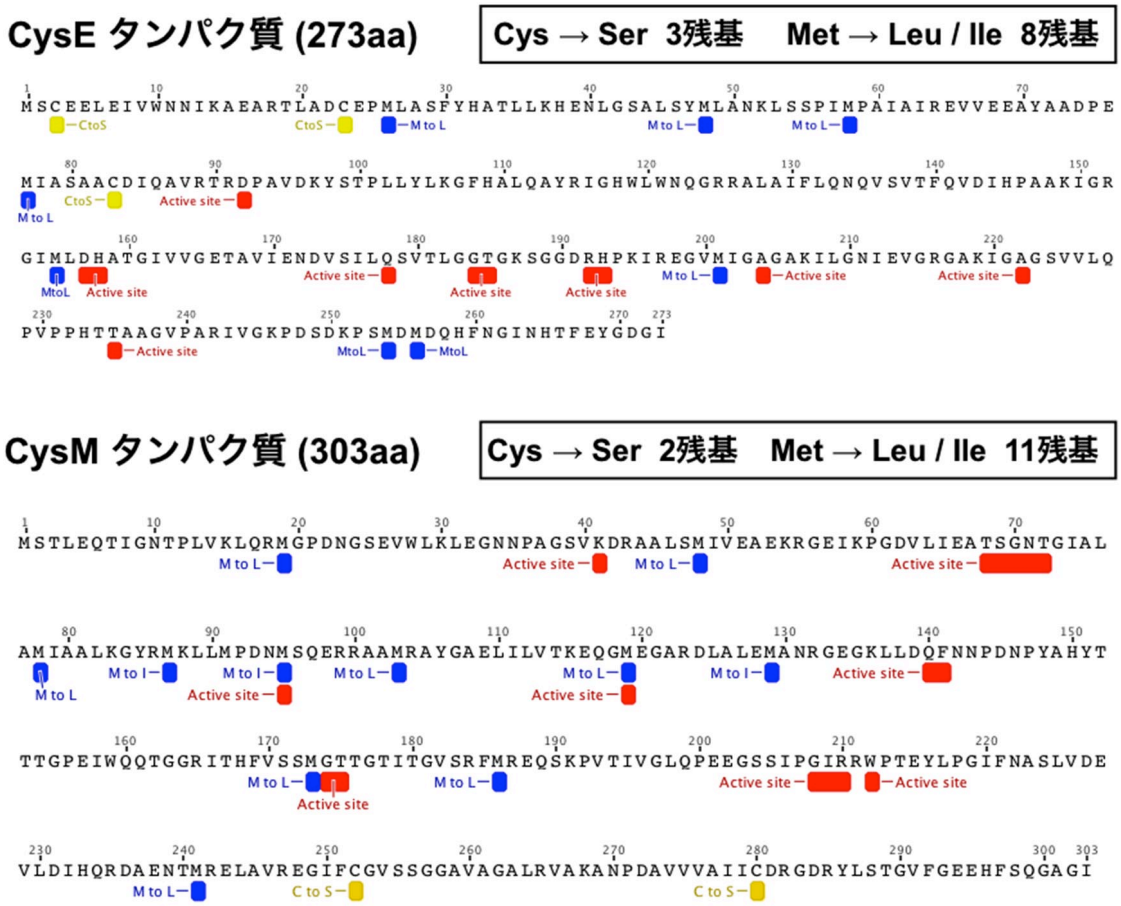


図 2. システイン合成酵素 CysE 及び CysM タンパク質におけるシステイン及びメチオニン残基置換
CysE タンパク質(273 残基)と CysM タンパク質(303 残基)の配列において置換したシステイン残基（黄色），メチオニン残基（青）そして活性中心部位（赤）を示す. アミノ酸 1 文字表記は以下の通り C:システイン S:セリン M:メチオニン L:ロイシン I: イソロイシン. (Fujishima et al., 2018 の図 4 と 5 を一部改変)

と *cysM-CM* 遺伝子も設計し遺伝子合成を委託注文した. 置換したアミノ酸残基の詳細なマップを図2に示す.

メチオニンはシステインと異なり，硫化水素を含んだミラーの実験でその存在が確認されており，原始地球の大気中で作られる可能性があることが示唆されている(Parker et al., 2011a). 一方でメチオニンを安定に供給するための生合成経路をみるとその硫黄源がシステインである場合が多い．したがってシステインとメチオニンの両方が配列に含まれていない極端なタンパク質も同様に合成し、試験することは，無機硫黄の有機物への固定反応を硫黄元素を全く含まないポリペプチドで再現できるかどうかを検証することは重要であると考えた.

合成したタンパク質の活性を検証する前段階として，システインとメチオニン残基の立体構造上の位置を大腸菌の CysE タンパク質 (PDB ID: 1T3D)及び CysM タンパク質 (PDB ID: 2BHS)で確認したところ，いずれのタンパク質もシステイン残基は活性中心部位から遠い位置に配置されており，その距離もジスルフィド結合形成に必要な平均距離の 2.3 Å (Bhattacharyya et al., 2004) に届かないことが確認できた．一方でメチオニン残基は CysM タンパク質において Met-58 および Met-95 が活性中心付近の基質エントリーポケット近傍に２つ配置されており，おそらく基質認識に関わるであろうことが示唆された. 以上のことから，少なくともシステインに関しては２つの酵素の活性には直接関係してこないことが予想された．我々はさらに情報学的なアプローチを用いて, CysE 及び CysM タンパク質のオーソログとの比較解析を通じてシステイン及びメチオニンの進化的な保存性を確認したところ，CysM タンパク質の活性中心近傍の Met-58 および Met-95 は近縁種において，非常によく保存されているが，それ以外のメチオニン及びシステイン残基に強い保存性は確認されなかった．したがってシステインの酵素の機能そのものへの関与は低いことが配列解析からも明らかとなった.

システインなしのシステイン合成酵素は機能するか?

そこでいよいよ改変タンパク質の機能を試すことになったのだが，一番わかりやすい方法として，大腸菌 K-12 株から *cysE* と *cysM* 遺伝子をそれぞれノックアウトしてシステイン要求性となった変異株を利用することにした. 大腸菌は 20 種類全てのアミノ酸合成経路を持つため野生株は M9 最小培地と呼ばれる無機塩(ミネラル、リン酸、窒素源としてのアンモニウム塩等)にグルコース（炭素源）を加えて生育する．しかし大腸菌においてアセチルトランスフェラーゼをコードする *cysE* 遺伝子欠損株(*ΔcysE*), 及び２種類のスルフヒドリラーゼ *cysK/cysM* 遺伝子の二重欠損株(*ΔcysKΔcysM*)は，システイン合成反応が最後まで進まないため生育することができず，システイン要求性となる．したがって導入する改変タンパク質が CysE や CysM の機能を補完することができれば，それを菌の増殖回復という表現型で確認することが可能となる．今回用いた *ΔcysE* 株は大腸菌 K-12 株の一遺伝子欠損株コレクションである”Keio collection” (Baba et al., 2006) から提供してもらい，*ΔcysKΔcysM* の二重欠損株に関しては新たに作成することに成功した．これらの欠損株は M9＋グルコースの寒天培地において 30℃で 7 日間培養後もコロニー形成は見受けられなかったが，システイン添加によりその生育が回復することから，システイン要求性であることが確かめられた．そこで早速配列中にシステインを配列に含まない *cysE-C* とシステインと開始メチオニン以外のメチオニンを含まない *cysE-CM* 遺伝子を *ΔcysE* 株にそれぞれ形質転換し，プラスミドを維持するグルコース添加した M9 最小培地 で 30℃で液体培養した結果，生育回復の速度に差はあるものの, *cysE-C* 遺伝子も *cysE-CM* 遺伝子も両方とも *cysE* 遺伝子の欠損を補完することができることが，OD 測定による大腸菌の増殖によって確認された(図 3).

システインを配列中に含む野生型の *cysE* 遺伝子で補完した場合は大腸菌の遅延期が 10 時間と長かったのに対し，*cysE-C* 遺伝子は非常に短い時間（約１時間）で遅延期を脱していることがわかった（図 3）これはおそらく野生型の CysE タンパク質がシステイン残基を持つために，システイン欠乏下で野生型のシステイン合成酵素を作るためには，細胞内のタンパク質が分解されることで，遊離システインが供給されるのを待つ必要があるからだと推測される. 逆に CysE-CM タンパク質はシステインもメチオニンも合成には必要ないが，タンパク質の酵素活性が 2.6 μmol/min/mg と野生型 CysE タンパク質の 25.5 μmol/min/mg に比べて 1/10 倍の効率しかないことがエルマン試薬を用いた生化学実験によって確認された．したがって，*cysE-CM* 遺伝子の場合，システインの新規合成が著しく遅いがゆえに，遅延期が長くなってしまうと考えられる.

それでは *cysM* 遺伝子の場合はどうだろうか？ *ΔcysKΔcysM* 二重欠損株を *cysM-C* 遺伝子で形質転換すると，20 時間ほど遅延期があるものの，最終的にシステイン要求性が解消され増殖を確認することが

できた（図 3）．タンパク質自体は *in vitro* の実験で活性を維持していたことから，*cysM-C* 遺伝子で遅延期がみられた理由はおそらくスルフヒドリラーゼ特有の多様な硫黄含有有機物の認識(Zocher et al., 2007)を考慮すると，大腸菌内での硫黄代謝バランスが CysM-C タンパク質の過剰発現によって崩れ，遅延期が生じたと考えられる．一方で *cysM-CM* 遺伝子による形質転換株ではそもそも生育増殖を確認することはできなかった．大きな原因として CysM-CM タンパク質の精製を試みた段階ですでに大部分が不溶化しており，やはり 11 箇所のメチオニン置換はタンパク質の構造安定性を著しく下げる結果となったと考えられる．いずれにせよ，一連の増殖回復実験によりシステイン残基を全て置換したタンパク質（CysE-C と CysM-C）がシステインを合成する２つの反応を担うことを証明することができた．アミノ酸の種類を減らした機能性タンパク質の研究報告は多々あるが(Akanuma et al., 2002; Amikura et al., 2014)，アミノ酸合成経路を最終生成物のアミノ酸を使わずに補完した例はこれが初の報告となった．

結論

今回の一連の実験は「原始生命において非生物的に得られにくいアミノ酸が遺伝暗号表に加わるためには，安定的なアミノ酸供給が細胞内の生化学的な反応で達成されなければいけない」という仮説に立脚している．そこでシンプル且つ幅広い生物種で保存されているセリンからのシステイン合成経路に関わる２種類の酵素からシステインを取り除くことで，最終生成物のアミノ酸を含まないポリペプチドが，新しいアミノ酸を合成できることを実験的に証明することができた．遺伝暗号表の進化がアミノ酸の生合成によって次第に拡張してきたというシナリオは，今回のような合成生物学的手法でアミノ酸の種類を限定した改変酵素を作成し，その活性を見ていく事でより詳細な裏付けが可能となるだろう．今回は大腸菌のタンパク質をもとに改変タンパク質を作成したが，今後は反応活性中心近傍の構造に特化した再構成など，より原始的で短く機能を維持するようなポリペプチドの探索が生命の起源研究の分野において期待されるだろう．

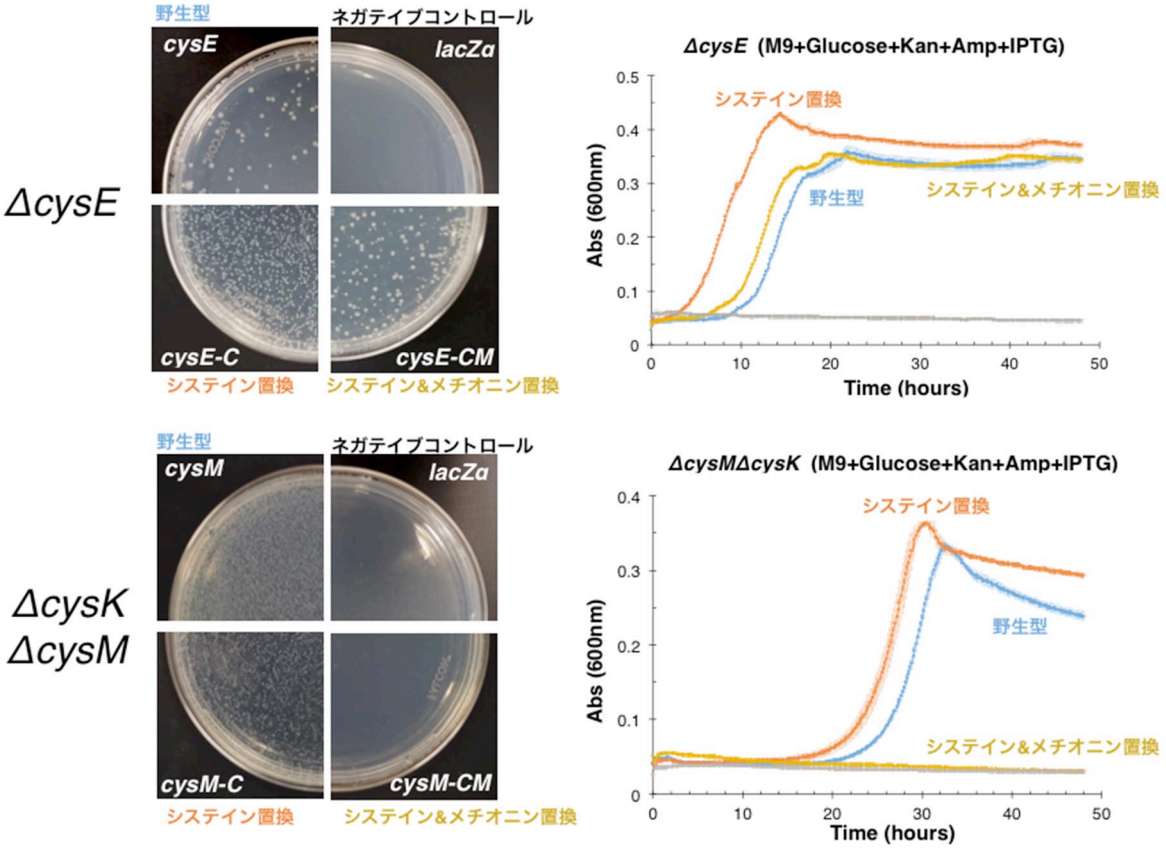


図 3. システイン要求性大腸菌変異株の増殖回復実験
CysE タンパク質(273 残基)と CysM タンパク質(303 残基)の配列において置換したシステイン残基（黄色），メチオニン残基（青）そして活性中心部位（赤）を示す．アミノ酸 1 文字表記は以下の通り C:システイン S:セリン M:メチオニン L:ロイシン I: イソロイシン. (Fujishima et al., 2018 の図 2 を一部改変)

参考文献

1) Akanuma, S., Kigawa, T., Yokoyama, S., 2002. Combinatorial mutagenesis to restrict amino acid usage in an enzyme to a reduced set. Proc Natl Acad Sci U S A. 99, 13549-53.
2) Amikura, K., Sakai, Y., Asami, S., Kiga, D., 2014. Multiple Amino Acid-Excluded Genetic Codes for Protein Engineering Using Multiple Sets of tRNA Variants. Acs Synthetic Biology. 3, 140-144.
3) Baba, T., et al., 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. Mol Syst Biol. 2, 2006 0008.
4) Beinert, H., Holm, R. H., Munck, E., 1997. Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. Science. 277, 653-9.
5) Bhattacharyya, R., Pal, D., Chakrabarti, P., 2004. Disulfide bonds, their stereospecific environment and conservation in protein structures. Protein Engineering Design & Selection. 17, 795-808.
6) Danger, G., Plasson, R., Pascal, R., 2012. Pathways for the formation and evolution of peptides in prebiotic environments. Chemical Society Reviews. 41, 5416-5429.
7) Ferla, M. P., Patrick, W. M., 2014. Bacterial methionine biosynthesis. Microbiology. 160, 1571-84.
8) Fujishima, K., et al., 2018. Reconstruction of cysteine biosynthesis using engineered cysteine-free enzymes. Sci Rep. 8, 1776.
9) Glavin, D. P., Callahan, M. P., Dworkin, J. P., Elsila, J. E., 2010. The effects of parent body processes on amino acids in carbonaceous chondrites. Meteoritics & Planetary Science. 45, 1948-1972.
10) Higgs, P. G., Pudritz, R. E., 2009. A thermodynamic basis for prebiotic amino acid synthesis and the nature of the first genetic code. Astrobiology. 9, 483-90.
11) Ibba, M., Becker, H. D., Stathopoulos, C., Tumbula, D. L., Söll, D., 2000. The adaptor hypothesis revisited. Trends in Biochemical Sciences. 25, 311-316.
12) Kitabatake, M., So, M. W., Tumbula, D. L., Soll, D., 2000. Cysteine biosynthesis pathway in the archaeon *Methanosarcina barkeri* encoded by acquired bacterial genes? J Bacteriol. 182, 143-5.
13) Lu, Y., Freeland, S., 2006. On the evolution of the standard amino-acid alphabet. Genome Biol. 7, 102.
14) Makino, Y., et al., 2016. An archaeal ADP-dependent serine kinase involved in cysteine biosynthesis and serine metabolism. Nat Commun. 7, 13446.
15) Morzycka, E., Paszewski, A., 1979. Two pathways of cysteine biosynthesis in *Saccharomycopsis lipolytica*. FEBS Lett. 101, 97-100.
16) Parker, E. T., et al., 2011a. Prebiotic synthesis of methionine and other sulfur-containing organic compounds on the primitive Earth: a contemporary reassessment based on an unpublished 1958 Stanley Miller experiment. Orig Life Evol Biosph. 41, 201-12.
17) Parker, E. T., et al., 2011b. Primordial synthesis of amines and amino acids in a 1958 Miller H2S-rich spark discharge experiment. Proc Natl Acad Sci U S A. 108, 5526-31.
18) Reetz, M. T., Wu, S., 2008. Greatly reduced amino acid alphabets in directed evolution: making the right choice for saturation mutagenesis at homologous enzyme positions. Chem Commun (Camb). 5499-501.
19) Sauerwald, A., et al., 2005. RNA-dependent cysteine biosynthesis in archaea. Science. 307, 1969-72.
20) Sevier, C. S., Kaiser, C. A., 2002. Formation

and transfer of disulphide bonds in living cells. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 3, 836-847.

21) Walter, K. U., Vamvaca, K., Hilvert, D., 2005. An active enzyme constructed from a 9-amino acid alphabet. J Biol Chem. 280, 37742-6.

22) Yuan, J., et al., 2010. Distinct genetic code expansion strategies for selenocysteine and pyrrolysine are reflected in different aminoacyl-tRNA formation systems. FEBS Letters. 584, 342-349.

MINI REVIEW

Matsumura S

Relationship between replicator evolution and cellularity explored by microfluidics s

マイクロ流体デバイスで迫るレプリケーターの進化と細胞との関係

富山大学 大学院理工学研究部（理学）
松村 茂祥

Graduate School of Science and Engineering, University of Toyama, 3190 Gofuku, Toyama, 930-8555, Japan

Corresponding author: Shigeyoshi Matsumura , smatsumu@sci.u-toyama.ac.jp
Phone: +81-76-445-6640, Fax: +81-76-445-6549

Received: Mar. 29, 2019/ Accepted: Dec. 15, 2019

Abstract One of the most important features of life must be self-replication. Appearance of replicators harboring information should be an essential process in origins of life. The RNA world hypothesis proposes that the replicators could accumulate mutations and selected, leading evolution of novel functions, and finally the life came out. The scenario is, however, supposed to be unrealistic in uniform (bulk) solution since functional RNAs would be exterminated by non-functional ones (parasites). Theoretical aspects have shown that protocell-like compartments encapsulating the replicators would solve this problem by suppressing the parasite diffusion and providing compartment-based group selection. Several studies have verified this theory by experimental evolutions, but advancement of “droplet microfluidics”, leading edge technology handling water-in-oil emulsion droplets very fast and precisely, is able to make such experiments highly quantitative. Recent study has demonstrated that molecular diversity could spontaneously emerge when a few different RNA replicators are compartmentalized in a same droplet and selected as a group, potentially providing an opportunity for further functional evolution. This review overviews such constructive studies approaching “origins of genetic information and evolution”, and droplet microfluidic technology.

Keyword: Replicator, RNA world, Microfluidics, Parasite, Diversit)

キーワード：レプリケーター、RNA ワールド、マイクロ流体デバイス、寄生体、多様性

はじめに

生命はどのようにして生まれたのか、すなわち生命の起源は、科学者のみならず多くの人の関心を集める、科学においてもっとも難解な問題の一つであろう。生命の起源について探求することは、非生命と生命の境界、すなわちある種の極限状態での生命について考えることとほぼ同義であり、これは単なる過去の事柄のみならず、生命はどのような条件で誕生しうるのかという現在および未来の問題までを含む、もっとも根源的なテーマの一つである。地球上で過去どのようにして生命が始まったのかという「歴史」を証明することは容易ではない。しかし、生命の起源においてあり得た状況の一部を抽出し、実験での再構成および検証を行うことで、生命が成立しうる一般的な条件を探索する試みが、近年、精力的に進められている [1)]。

生命の起源問題には、生命の原材料となる分子の起源、エネルギー獲得システムの起源、遺伝情報と進化の起源など、さまざまな課題が山積している。本稿では、「遺伝情報と進化の起源」を構成的に研究

する試みについて、筆者らの最近の研究を中心に、概説したい。

レプリケーターの出現・進化と原始細胞

生命がもつもっとも重要な特徴の一つは、自己複製であろう。すなわち、情報をもち自己複製の可能な高分子（レプリケーター）の成立は、生命の始まりにおいて非常に重要な過程だと考えられる。現在の生命において、この「遺伝情報の蓄積と継承」を担っている分子は、核酸である。さらに、RNA は複雑な立体構造を形成し、触媒活性などの機能も持ちうるため、生命は RNA から始まったとする「RNA ワールド仮説」が提唱され、一定の支持を得ている [2)]。自らのコピーを作ることができるレプリケーター RNA が出現すると、そこから変異によりさまざまな RNA 分子が生じ、さらに自然淘汰が働くことで新しい機能をもつ RNA の創発と進化が起こり、最終的に生命の誕生につながる。これが RNA ワールドの進化シナリオである [3)]。

しかし、このようなシナリオが実際に起こり得るのかを注意深く考えてみると、これはそう簡単ではないことに気づく。何らかの機能をもつ RNA は、そうでないものに比べて複雑な構造をとると考えられる。RNA 分子がある機能を有するためには、一定以上の長さの鎖長がなければならず、かつそれが折りたたまれ安定な立体構造を形成する必要があったであろう。RNA の複製はリボヌクレオチドを 1 つずつ重合することで行われるため、鎖長が長くなるほど複製速度は低下する。また、複製の際には折りたたまれた立体構造を一度ほどいて鋳型とする必要があるため、構造が安定な RNA ほど複製が遅くなる傾向がある。総じて、複雑な構造をもつ分子の複製速度は遅くなるため、機能構造をもたない単純な分子との競争においては不利となり、最終的には駆逐されてしまう（図 1A）。Spiegelman らは、RNA ウイルスのゲノム複製反応を試験管内で繰り返す実験を行い、ゲノムがどのように変化するかを解析した [4)]。すると、変異により複製速度の速い RNA 分子が現れ、ゲノムはどんどん短くなり、74 世代の複製反応後には、ゲノムの実に 83%が消失した。これは、複製速度の点から言えば進化だが、ゲノムの機能情報という観点から見るとむしろ退化である。（このような、複製は速いがそれ以外の機能をもたない分子は寄生体と呼ばれる。）つまり、このような状況ではレプリケーターからの分子機能の進化は起こり得ないと考えられ、生命は誕生できない。

では、この問題はどのようにすれば解決できるだろうか？ まず、生命起源の最初期段階、すなわちレプリケーターが出現する時点で、原始細胞（protocell）のような容器の存在を仮定する [5,6,7)]。その内部にレプリケーターが封入されて複製されるような状況が生じれば、上記の事態を回避できることが、理論的に提唱されている [8,9)]。その理由の 1 つは、(1) 微小容器への区画化により寄生体 RNA の迅速な拡散が抑制されることである。そしてより重要なもう 1 つの理由は、(2) 選択の対象が、個々の RNA 分子の複製速度から細胞の特性へと、階層が 1 段階上がることである。その結果、レプリケーターが細胞の生存に有利になる機能をもっている場合は、それが複製速度に優先して選択されることになり、レプリケーターの機能消失は避けられる（図 1B）。

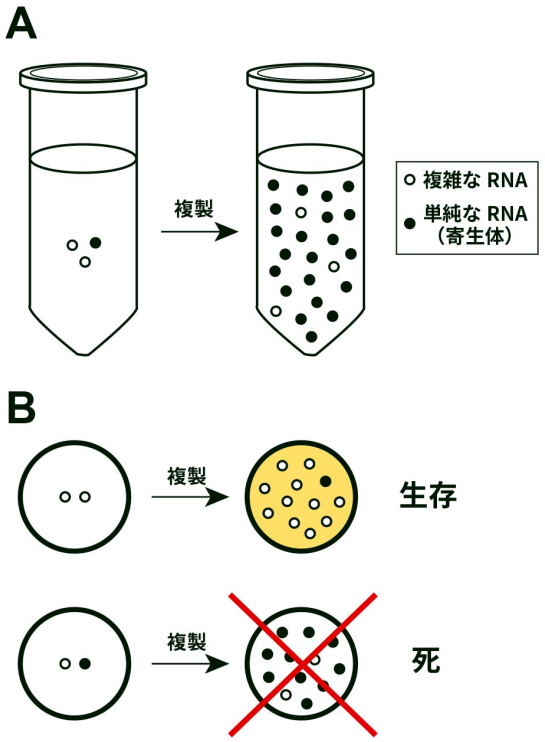


図 1. 異なる環境における、レプリケーターRNA の予想される機能進化
A) 均一溶液（バルク）系でのレプリケーターRNA の進化。複雑な RNA は、単純な RNA（寄生体）に比べて複製速度が遅いため、いずれ駆逐される。このような条件では、レプリケーターの複雑化は起こらない。
B) 原始細胞のような区画を想定した場合のレプリケーターの進化。区画を対象とした選択圧がかかることにより、複製速度に劣る複雑な RNA が維持される。

このような仮説を実験で検証する試みは、近年いくつか行われている。油中水エマルジョンや脂質二

重膜小胞（リポソーム）を原始細胞モデルとして用い、その内部に RNA や自己複製系を封入し、実験進化を行っている [10,11,12,13]。しかし、エマルジョンやリポソームを均一に精度良く作製するのは技術的に難しかったため、実験条件を厳密に制御し、上記のような理論を正確に検証することは、これまでほとんど不可能であった。

液滴マイクロ流体システム

ガラス等の基板上にマイクロメートルサイズの微細な流路を構築し（図 2A）、その内部で微量の液体を操作して化学反応の制御を行う技術は、マイクロ流体工学と呼ばれる。この分野では近年、流路内に微小な液滴（油中水エマルジョン）を作り出し操作する技術体系が著しい発展を見せており、液滴マイクロ流体システム（Droplet microfluidics）と呼ばれている [14]。

まず、ピコリットルサイズ（直径 10～100 μm）の液滴を、非常に均一に（サイズ分布誤差 5%以下）かつ高速に（毎秒数千個）作製することができる（図 2B）。作製された液滴は界面活性剤により安定化されており、通常の条件では合一することはなく、数ヶ月のオーダーで安定である。液滴の内部には水溶性の物質であれば基本的に何でも封入することができ、かつ界面活性剤は核酸やタンパク質が関わる通常の生化学反応には干渉しない。つまり、個々の液滴は微小なマイクロリアクターと見なすことができ、その内部でさまざまな反応を独立かつ平行に行うことが可能である。さらに、個々の液滴の蛍光強度を解析し、特定の液滴のみを高速で（毎秒数百個）分取することもできる（図 2C）。すなわち、個々の液滴に異なった分子をそれぞれ封入しハイスループット・スクリーニングを行うことで、実験進化を行うことが可能である。

この技術を用いることで、液滴、すなわち細胞モデルの大きさを極めて正確に制御できる。つまり、1 つの液滴に封入する RNA 分子数などの実験条件を精密に設定することができる。また、分取の際の液滴の蛍光強度の閾値を自在に変えることで、選択圧も柔軟に設定することができる。

レプリケーターRNA の液滴内進化実験

そこで我々は、この液滴マイクロ流体システムを用いて、RNA が細胞様の容器に封入され、そこで複製が起き、かつ細胞が淘汰を受ける条件下において、レプリケーターの集団がどのように変化していくかを解析した [15]。

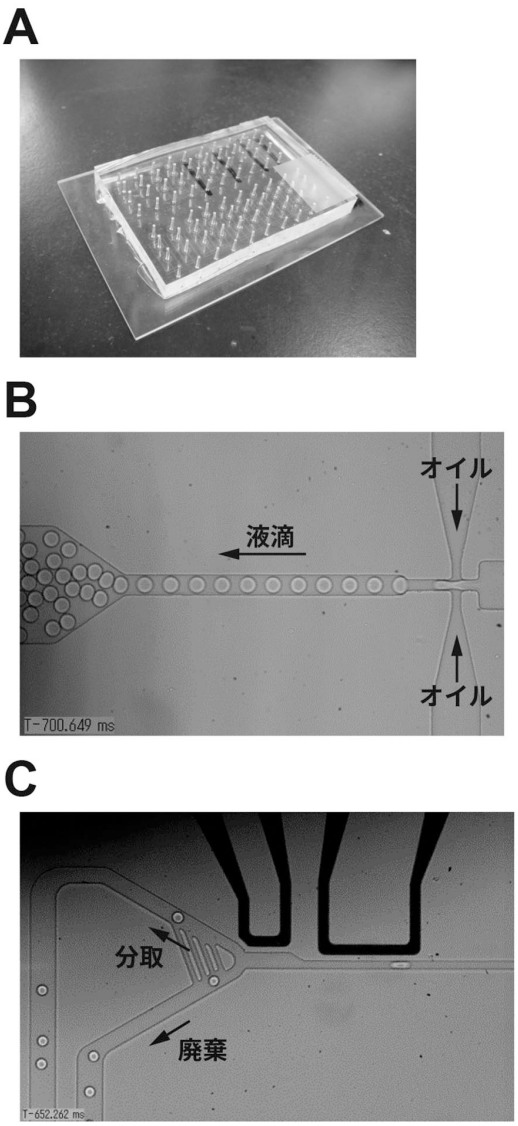


図 2. 液滴マイクロ流体システム
A) マイクロ流体デバイス。シリコーン樹脂（ポリジメチルシロキサン、PDMS）上にマイクロメートルサイズの溝を成形し、ガラスと貼り合わせることで流路を構築する。
B) 液滴の生成。ピコリットルサイズ（直径 10～100 μm）の液滴を、非常に均一かつ高速に作製できる。水相のフローを、界面活性剤を含む油相で挟み込むことで、液滴を作り出す。
C) 液滴の分取（ソーティング）。それぞれの液滴の蛍光強度をリアルタイムで計測し、望みの液滴にのみ電場を与えることで電極（黒の線）に引きつけ、液滴を分取する。

まず、レプリケーターRNA を構築した。タンパク質酵素 Qβレプリカーゼにより複製される Midivariant RNA と RNA 切断活性をもつ Varkud satellite（VS）リボザイムを融合させた。これにより、Qβレプリカーゼの存在下で自己複製し、かつ触媒

活性（RNA 切断活性）をもつレプリケーターRNA を構築できた。

次いで、このレプリケーターRNA を、Qβレプリカーゼ、NTP、蛍光基質 RNA などとともに、液滴マイクロ流体システムを用いて約 10 pL の液滴に封入した。封入されたレプリケーターRNA は液滴内で Qβレプリカーゼにより複製され、さらに、複製された RNA は VS リボザイム部位がもつ触媒活性により基質 RNA を切断する。その RNA 切断活性は、蛍光基質 RNA を用いて検出が可能である。約 100 万個の液滴の蛍光強度を解析し、一定以上の蛍光をもつ液滴を分取し、そうでない液滴を廃棄した。これは、一定以上の触媒活性を内部に有する液滴は生存し、閾値以下の活性しかもたない液滴は淘汰される、という選択圧がかかっている状態だと言い換えることができる（図 3A）。そして、分取した液滴を破壊して内部の RNA を回収・混合し、再び液滴に封入して選択する、という上記の過程を繰り返した。9 ラウンドの操作の結果、レプリケーターRNA は駆逐されずに残存した。より具体的には、寄生体 RNA は出現したものの、レプリケーターRNA は絶滅せず、両者が共存する平衡状態に達した。すなわち、触媒活性をもつレプリケーターが区画化され、それが区画に対して淘汰上の利益をもたらす場合には、レプリケーターの触媒機能は維持されることが示された。

区画化による異種 RNA の共存と多様性の創発

前述のように、マイクロ流体システムを用いることで、液滴 1 つあたりに封入される RNA 分子数を精密に制御することができる。興味深いことに、封入される RNA 分子数が少ない場合（≈ 0.6 個）、平衡状態での全 RNA に占めるレプリケーターRNA の割合は高くなり（83%、残りの 17%は寄生体 RNA）、対して、RNA 分子数が多い場合（≈ 6.9 個）は、レプリケーターRNA の割合は低くなった（28%）。この結果は、液滴に封入される RNA 分子数が多くなるほど、レプリケーターRNA と寄生体 RNA の共存（共生）がより顕著になることを示している。そこで、RNA 分子数が少ない場合と多い場合のそれぞれにおいて、どのような複製速度をもつ寄生体 RNA が出現してくるのかを、数理シミュレーションにより解析した。すると、RNA 分子数が少ない場合は複製の速い寄生体 RNA のみが現れるが、RNA 分子数が多い場合は、複製が遅い寄生体 RNA のほうが優勢となることが示唆された。実際に実験で得られた RNA について調べたところ、予想されたとおり、

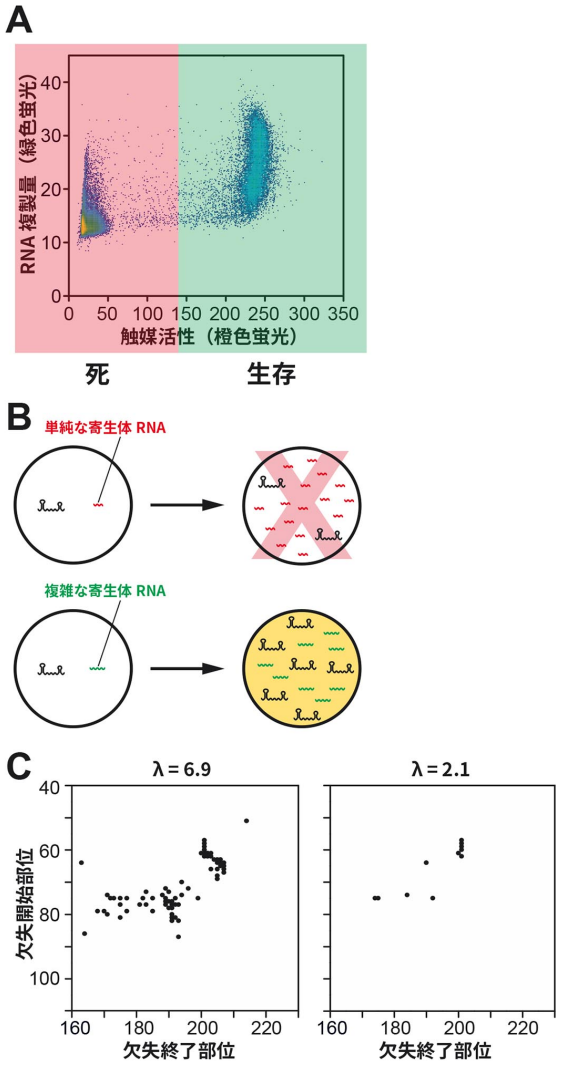


図 3. レプリケーターRNA の液滴内進化実験
A) 液滴の分布を示す二次元図とソーティング閾値。横軸を液滴内の触媒活性、縦軸を RNA 複製量とし、各液滴をプロットすると、典型的にはこのような分布になる。約 140 の触媒活性を分取の閾値として設定することで、それ以上の触媒活性をもつ液滴は生存し、それ以下の活性しかもたない液滴は淘汰される、という選択圧をかける。B) 複雑な（複製の遅い）寄生体 RNA が優勢となる機構。レプリケーターと単純な（複製の速い）寄生体（赤色）が共存すると、寄生体が圧倒的に優勢となり、その液滴は触媒活性をほとんど失ってしまうため、生存できない。複雑な（複製の遅い）寄生体（緑色）が共存すると、レプリケーターの量はそれほど減らないため、その活性も維持され、生存できる。
C) 液滴内の RNA 分子数と寄生体 RNA の多様性。寄生体は、レプリケーターの一部の配列が欠失することで生じる。次世代シーケンサーで寄生体の配列を網羅的に解析し、各寄生体について、欠失が開始する位置と終了する位置をそれぞれ縦軸と横軸にとり、プロットした。λは、一つの液滴に封入される RNA 分子の平均個数。λ= 2.1 の条件に比べ、λ= 6.9 のほうが明らかに寄生体の分子種が多く、広く分散している。

RNA 分子数が多い状態で進化してきた寄生体 RNA の複製速度は比較的遅く、同じ液滴内のレプリケーターRNA の活性を大きくは毀損しなかった。すなわち、レプリケーターRNA と複製の速い寄生体 RNA が同じ液滴に共存した場合、複製速度に勝る寄生体 RNA が圧倒的に優勢となり、その液滴はレプリケーターRNA の活性をほとんど失ってしまうため、生存できない（図 3B）。対して、複製の遅い寄生体 RNA が共存した場合は、レプリケーターRNA の量はそれほど減らないため、その活性も維持され、生存できる。結果として、複製の遅さがむしろ生存に有利な形質となり、そのような寄生体 RNA が進化したと考えられる。

また、複製の速い寄生体 RNA は変異に対して鋭敏である（小数の変異で容易に複製速度が低下する）のに対して、複製の遅い寄生体 RNA は変異に対して寛容である（多少の変異が入っても複製速度が大きくは変化しない）と予測できる。すなわち、複製の遅い寄生体 RNA が優勢になるような状況では、寄生体 RNA 分子に（ほぼ）中立な変異が蓄積し、分子の大きさや配列に多様性が許容され、そこからより複雑な配列が生じるのではないかと考えられる。そこで、液滴内の RNA 分子数が多い状態（≈6.9 個）と少ない状態（≈2.1 個）で得られた寄生体 RNA を次世代シーケンサーでそれぞれ網羅的に解析した。すると、RNA 分子数が多い状態において、有意に寄生体 RNA の多様性が増大していた（図 3C）。このことは、異種の RNA が同一の区画に封入され、その区画全体に選択圧がかかることで、個々の分子にとって不利な形質が全体としては有利に働く状況が生まれ、結果として分子の多様性が自発的に増大したことを意味している。

この結果は、進化の原動力である分子の多様性がいかにして生じ維持されるのか、という問いに対し、一つの示唆を与える。それは、区画内に複数のレプリケーターが存在する場合、そのいくつかが選択圧より解放され、そこに変異が蓄積していくということであり、この現象は遺伝子重複による進化との類似性を想起させる[16]。変異が蓄積することで増大した多様性は、そこから新規な機能が生じる次のイノベーションの原動力になり得るかもしれない。すなわち、レプリケーターが区画に封入され選択を受け、そこから分子の多様性が自発的に生み出され、その多様性を基盤として新しい分子機能が進化する、そういったプロセスが生命誕生には必須であったであろうことが本研究より示唆される。

おわりに

本稿では、「遺伝情報がどのように現れ、それがいかに進化し得たのか？」という問題に対する実験的アプローチについて述べてきた。これは生命の起源だけではなく、進化の一般的メカニズムにも関わる重要な問題である。これは、「進化の原動力である多様性がいかに生ずるか？」という問題だと言い換えることもできる。ある分子機能が進化するということは、特定の配列に収束してゆくことを意味し、その結果、多様性は減少する。機能が進化しつつ、どのように多様性が維持されるのか。近年の構成的な実験研究により、その機構が徐々に明らかになってきている[13,17]。

進化の研究はこれまで、自然界で起こってきた現象の解析という側面が強かった。しかし、近年の技術革新により、進化現象を実験により再現することが可能になりつつある。本稿で解説した液滴マイクロ流体システムは、その一端である。このような技術を取り入れることで、進化を実験で再構成・検証することで理解するという研究の潮流は、ますます大きくなっていくであろう。

参考文献

1) Pressman, A., Blanco, C., and Chen, I. A. 2015. The RNA world as a model system to study the origin of life. Curr. Biol., 25: R953-R963.
2) Robertson, M. P., and Joyce, G. F. 2012. The origins of the RNA world. Cold Spring Harb. Perspect. Biol., 4: a003608.
3) Hernández, A. R., and Piccirilli, J. A. 2013. Chemical origins of life: Prebiotic RNA unstuck. Nat. Chem., 5: 360-362.
4) Mills, D. R., Peterson, R. L., and Spiegelman, S. 1967. An extracellular Darwinian experiment with a self-duplicating nucleic acid molecule. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 58: 217-224.
5) Dobson, C. M., Ellison, G. B., Tuck, A. F., and Vaida, V. 2000. Atmospheric aerosols as prebiotic chemical reactors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97: 11864-11868.
6) Kanavarioti, A., Monnard, P. A., and Deamer, D. W. 2001. Eutectic phases in ice facilitate nonenzymatic nucleic acid synthesis. Astrobiology, 1: 271-281.
7) Szabó, P., Scheuring, I., Czárán, T., and Szathmáry, E. 2002. In silico simulations reveal

that replicators with limited dispersal evolve towards higher efficiency and fidelity. Nature, 420: 340-343.

8) Szathmáry, E., and Demeter, L. 1987. Group selection of early replicators and the origin of life. J. Theor. Biol., 128: 463-486.

9) Szathmáry, E., and Smith, J. M. 1995. The major evolutionary transitions. Nature, 374: 227-232.

10) Engelhart, A. E., Adamala, K. P., and Szostak, J. W. 2016. A simple physical mechanism enables homeostasis in primitive cells. Nat. Chem., 8: 448-453.

11) O'Flaherty, D. K., Kamat, N. P., Mirza, F. N., Li, L., Prywes, N., and Szostak, J. W. 2018. Copying of mixed-sequence RNA templates inside model protocells. J. Am. Chem. Soc., 140: 5171-5178.

12) Ichihashi, N., Usui, K., Kazuta, Y., Sunami, T., Matsuura, T., and Yomo, T. 2013. Darwinian evolution in a translation-coupled RNA replication system within a cell-like compartment. Nat. Commun., 4: 2494.

13) Bansho, Y., Furubayashi, T., Ichihashi, N., and Yomo, T. 2016. Host-parasite oscillation dynamics and evolution in a compartmentalized RNA replication system. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 113: 4045-4050.

14) Guo, M. T., Rotem, A., Heyman, J. A., and Weitz, D. A. 2012. Droplet microfluidics for high-throughput biological assays. Lab Chip, 12: 2146-2155.

15) Matsumura, S., Kun, Á., Ryckelynck, M., Coldren, F., Szilágyi, A., Jossinet, F., Rick, C., Nghe, P., Szathmáry, E., and Griffiths, A. D. 2016. Transient compartmentalization of RNA replicators prevents extinction due to parasites. Science, 354: 1293-1296.

16) Ohno, S. 1970. Evolution by Gene Duplication. Springer, New York.

17) Mizuuchi, R., and Ichihashi, N. 2018. Sustainable replication and coevolution of cooperative RNAs in an artificial cell-like system. Nat. Ecol. Evol., 2: 1654-1660.

MINI REVIEW

Kubota H

Basic science studies on microbiology contribute to product development in an aspect of microbial control

微生物制御に関わる製品の開発につながるベーシックサイエンス

花王株式会社　スキンケア研究所
久保田浩美

Kao Corporation Skin Care Products Research, 2-1-3, Bunka, Sumida-ku, Tokyo 131-8501, Japan

Corresponding author: Hiromi Kubota, kubota.hiromi@kao.com
Phone: +81-3-5630-9401, Fax: +81-3-5630-9330

Received: Mar. 16, 2020 / Revised : Mar. 18, 2020/ Accepted: Mar. 18, 2020

Abstract There are various microorganisms constantly in our environment. Many of these microorganisms provide significant benefits to human life and health while others can cause harm. For example, the latter can directly endanger the health of people through infections, allergies, and food poisoning, and in some cases, they can claim lives. In the natural environment or living environment, microorganisms cause unpleasant phenomena, such as odor generation, microbial coloration, food spoilage, and biodeterioration. Unpleasant odors generated in laundry, clothes or shoes, black mold and pink stains (pink biofilm) in bathrooms, slimy sponges in the kitchen, slime in the drain port, bacterial corrosion of piping, deterioration of leather, food rot, and expansion of packages are familiar to us in our everyday lives.

Daily necessities familiar to life, such as fabric care, home care, oral care, hair care, and skin care products often function to reduce such unpleasant phenomena caused by microorganisms. One technique to do this is through “microbial control,” which is commonly termed "antimicrobial effect," "bactericidal effect," "disinfection," "eradication of bacteria," “microbiostasis," or "eradication of microbial biofilm."

For the first stage of research to develop a microbial control technology, it is necessary to have a deep understanding of the objects to be controlled, that is, the characteristics of the target environment and the microorganisms in it. We believe that basic science research will provide us with an important key to efficient technology development. In this paper, three cases are introduced as examples of such basic science research: 1) unpleasant odors generated on clothing and the major microorganisms involved, 2) pink biofilms commonly found in bathrooms and control of the dominant bacteria, and 3) skin characteristics and microbial analysis of each part of the hand, which has a complicated structure.

Keyword: basic science, microbial control, product development, laundry, malodor, bathroom, pink biofilm, hand skin, handwashing, 4-methyl-3-hexenoic acid, *Moraxlla osloensis, Micrococcus, Methylobacterium*

キーワード：ベーシックサイエンス、微生物制御、製品開発、衣類、生乾き臭、汗臭、浴室、ピンク汚れ、手指、手洗い、4-メチル-3-ヘキセン酸

はじめに

我々の身の回りには様々な微生物が存在し、我々は常に微生物と接して暮らしている。これらの微生物の存在は人の健康や生活に重要な役割を果たしているのであるが、時に人に危害を与え、また不快な思いをさせる。例えば、感染症を発症させる、アレルギーの原因となる、食中毒を起こすなど人に対して直接的に危害を与え、場合によっては命を脅かす。また、自然環境や生活環境においては、悪臭、汚れ、劣化、腐敗等の不快な現象を引き起こす原因にもなっている。衣類や靴などから発生する不快なニオイ、浴室のカビ汚れやピンク色の汚れ、台所スポンジのぬめり、排水口にみられるスライム、配管の腐食、革製品のカビによる劣化、食品の腐敗や変敗、パッケージの膨張等身近な例は枚挙にいとまがない。

一方、生活に身近な日用品、例えば、衣料用洗剤や仕上げ剤などのファブリックケア製品、台所用洗剤や住居用洗剤などのホームケア製品、歯磨き粉などのオーラルケア製品、シャンプーなどのヘアケア製品、化粧品類、洗顔料、ボデイソープ、ハンドソープなどのスキンケア製品等では、こういった微生物由来の危害を防いだり不快な現象を低減させたりする機能を有することが望まれる場合が多い。このような機能を発揮させる技術の一つとして、微生物を制御する（微生物制御：microbial control）技術がある。なお、「微生物制御」を広義にとらえると、例えば有用物質生産に向けた産生微生物の生育や代謝などのコントロール、活性汚泥のコントロールなどのような「有用微生物やその集合体のコントロール」を含むが、本稿では一般に「除菌」、「抗菌」、「静菌」、「殺菌」、「消毒」、「バイオフィルム除去」「バイオフィルム分散」などの言葉で代表されるような「人に有害な微生物やその集合体のコントロール」を指す。

筆者らは、製品の機能として必要な微生物制御技術を開発するためには制御する対象をしっかりと把握すること、すなわち、対象となる環境と制御すべき微生物を正しく理解することが近道であると考えて研究を進めてきた。まずは、“有害事象、あるいは不快な現象の認められる環境がどのような環境なのか”、“その環境のどこにどのような微生物がどれくらいどのように存在するのか”、そして“制御の対象となるべく微生物種はどのような状態で存在し、どのような特徴を有するのか”についての理解を深めた。まさにベーシックサイエンス研究が技術開発への鍵となると考え研究を実施している。

本稿では、このようなベーシックサイエンス研究の実例として 3 つのケースを紹介する。まずは、1）衣類から発生する不快なニオイの主要な成分やそれに関わる主な微生物について、次に 2）浴室などによくみられるピンク汚れに優占する微生物とその制御についての研究を紹介する。最後に、3）適切な手洗いの啓発活動や効果的な技術の提案を目指し、複雑な手指の構造に着目して手指の部位ごとに皮膚性状と微生物の状態を解析した例について紹介する。

１．衣類の不快なニオイ

日本においては洗濯ものを室内で干す場合が多く、干している間や乾燥後の使用時にいわゆる「生乾きのニオイ（生乾き臭）」を経験し、不快に感じる人が多い。また、衣類の着用中、汗をかくような運動をした場合等に衣類から汗のようなニオイ（汗臭）を強く感じ不快になる人も多い（弊社調べ）。

生乾き臭のキー成分は 4-メチル-3-ヘキセン酸である [5)]

竹内ら [5)] は、生乾き臭のニオイ強度の高い衣類を集め、溶剤抽出により臭気成分を回収した。ガスクロマトグラフィー質量分析計（GC-MS）およびニオイ嗅ぎガスクロマトグラフィー（GC-O）による Aroma Extract Dilution Analysis(AEDA)によって悪臭成分を特定した。さらに悪臭成分の中でも生乾き臭に特徴的なニオイである雑巾様臭を有する成分について分画し、Preparative Fraction Collector (PFC)に接続した GC を用いながら濃縮を繰り返し、最終的には物質を同定することができ、その寄与度を解析した。その結果、4-メチル-3-ヘキセン酸（4M3H）（図１）という微量にしか存在しないが嗅覚閾値の非常に低い物質が衣類の生乾き臭のキー成分であることが明らかとなった。

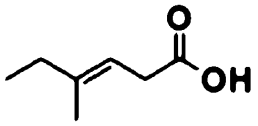


図１　4-メチル-3-ヘキセン酸（4M3H）

生乾きのニオイ発生に関与する主たる微生物は *Moraxella osloensis* である [3)]

4M3H の構造からニオイの発生には微生物の関わりがあると考え、生乾き臭を有する衣類から微生物を分離した。次に分離した微生物を滅菌した中古タオル片に接種し、一定時間培養後に発生する生乾き臭の官能評価と４M3H の定量解析を実施した [3)]。これらの結果、衣類上において 4M3H の発生に大きく関わる微生物として *Moraxella osloensis* の

表１．衣類[a]からの *Moraxella osloensis* の検出[3)]

アイテム	サンプル数	% 検出頻度[b]	生菌数 (c.f.u./cm^2)[c]	% >10^4 c.f.u./cm^2[d]
タオル類	21	86	1.0×10^1 –1.3×10^7	52
T シャツ	6	50	1.9×10^5 – 1.6×10^6	50
下着	6	33	1.8×10^2 – 2.4×10^4	16
靴下	10	50	2.1×10^3 –2.8×10^5	50
ズボン	5	0	ND[e]	ND
バスマット	6	17	2.7×10^5	17
枕カバー	3	67	1.2×10^3 – 2.9×10^4	67
シャツ(T シャツ以外)	2	50	1.0×10^1 – 4.4×10^1	0

[a], 国内 26 家庭よりニオイの有無にかかわらず 59 サンプルを集めた。
[b], 各アイテムにおいて *M. osloensis* が検出されたサンプルの割合を示す。
[c], 各アイテムの生菌数の幅（最小値－最大値）を表す。
[d], *M. osloensis* が 10^4 c.f.u./cm^2 以上であったサンプルの割合を示す。
[e], ND:検出されず。

存在が明らかとなった。*M. osloensis* は、Gammaproteobacteria の *Moraxellaceae* に属し、SCD 培地等で二連短桿菌の形状をとる。本菌種については様々な環境や人からの分離や検出について報告されていたが、衣類上での検出やニオイとのかかわりに関する報告はなかった。そこで国内の住環境や衣類について調査したところ、住環境の様々な箇所や衣類から本菌種が分離あるいは検出され、特にタオルなどの木綿の衣類からはニオイ発生の有無にかかわらず高頻度でかつ菌数多く分離された（表１）。また、分離源によらず試験に供したすべての *M. osloensis* 株が中古タオルから生乾き臭を発生させた。さらに様々なストレス耐性の視点からも洗濯環境中に生存しやすい特徴を有していた。

着用中に感じる汗臭（着用汗臭）に *Micrococcus* 属細菌が関わっている[1)]

一般家庭より洗濯後のＴシャツ､肌着等を回収し、この衣類を成人男性が着用して運動を行った[1)]。運動後回収した衣類の汗のようなニオイ成分の解析を実施した結果、単鎖・中鎖の複数の脂肪酸がニオイに寄与していた。次世代シーケンサーを用いた 16S rRNA 配列領域に基づく菌叢解析と分離株のニオイ類中の汚れ成分と *Micrococcus* 属細菌が関与することが示唆された。

２．浴室に見られるピンク色の汚れ（ピンク汚れ）

浴室の排水口、床、壁等ではピンク色の汚れ（ピンク汚れ）がよく認められる。その色により目立つ、こすらないと落ちない、落としてもすぐに再発するといった課題があり、生活者が浴室において気になる汚れとしてカビ汚れに次いで多く挙げられていた（弊社調べ）

ピンク汚れに優占する微生物種は *Methylobacterium* 属細菌である[4,6)]

国内の様々な家庭の浴室からピンク汚れ部分を採取し解析を行った[4,6)]。走査型電子顕微鏡(SEM)での観察、分離菌の解析、および Fluorescence in situ Fluorescence *in situ* hybridization（FISH）により解析を行った。値は 10 画像の平均値±標準偏差である。

表２　ピンク汚れ中の *Methylobacterium* 属細菌の割合の例[4)]

サンプル No.	*Methylobacterium* 属[a](%)	他の属[b]（%）	β-1,3-, -1,4-グルカン[c]（%）
1	81±13	3.4±6.3	15±14
2	55±3.2	0.1±1.7	45±5.5
3	96±21	0.6±3.2	2.9±1.5

[a] MB プローブ（*Methylobacterium* 属特有のプローブ）によってハイブリダイゼーションした体積
[b] EUB338 プローブ（細菌特有のプローブ）によってハイブリダイゼーションした体積
[c] calcofluor white により染色された体積

hybridization (FISH)による解析を行うことにより、ピンク汚れがバイオフィルム状態であり、この中に優占する微生物種は *Methylobacterium* 属細菌であることが明らかとなった（図２）。*Methylobacterium* 属細菌は、Alphaproteobacteria の *Methlobacteriaceae* に属し、細胞表層にカロチノイドを有することや細胞膜にステロールを有する特徴を持ち、植物と共生して存在することなどが知られている。浴室から分離された本属細菌は Potato Dextrose 培地（PDB）で良好に増殖し、浴室で優占する要因となる様々な特性を有していた。その特徴の一つとしてバイオフィルム状態でなくとも洗浄剤成分に対し比較的高い耐性を有することも判明したため、まずは本属に対して効果的に働く殺菌技術の開発を目指した。

***Methylobacterium* 属細菌に対して効果的な薬剤の組み合わせがある [4,7)]**

Methylobacterium 属細菌（浴室分離株）に対しては、浴室の清掃時間に相当するような短時間では殺菌効果が認められなかった濃度の界面活性剤であっても長時間接触させた場合には殺菌性が認められた。*Methylobacterium* 属細菌の特殊な表層構造が薬剤の作用障壁となる可能性も考えられたため、微生物表層への浸透促進に着目し、殺菌性のある基剤の効力を増強させることを試みた [4,7)]。その結果、界面活性剤（塩化ベンザルコニウム）といくつかの溶剤の組み合わせが本属の殺菌に有効であることが見いだされた。この組み合わせは塩化ベンザルコニウム単独ではほとんど効果のない濃度でバイオフィルム状態の菌に対しても効果を示した [4)]。

３．手指の皮膚性状と微生物

保育園や高齢者介護施設等の福祉施設における長時間の集団生活の増加、地球規模での人やモノの移動の高速化、あるいは国際的なイベント等によるマスギャザリングの増加により、感染症の集団発生リスクの高まりや地球規模での流行が懸念されている。このような集団感染や感染拡大の予防としては様々な対策が講じられており、手洗いの実施もその一つとして非常に重要であると考えられている。一方、手は、爪、指、関節等を有する複雑な形状をもち、手洗いにおいては部分的な汚れの洗い残しが多いという課題もあり、このような課題を解決するために手洗いの啓発活動や技術研究が広く行われている。

爪と指の間の菌数は他の部位と比べて多い [2)]

健常肌（手指に明確な皮疹を有しない）の成人男女（非医療従事者）を対象に、手洗いの実態、手の各部位の肌性状（手荒れ有無、角層水分量・pH・温度等）、細菌状態を把握することを試みた。手の甲、指の間、手の平、指の腹及び爪と指の間を対象にスワブ法によるサンプリング後、生菌数の測定および次世代シーケンサーを用いた 16S rRNA 配列領域に基づく菌叢解析を実施した。その結果、SCD 培地を用いた好気的条件および BHI 培地を用いた嫌気的条

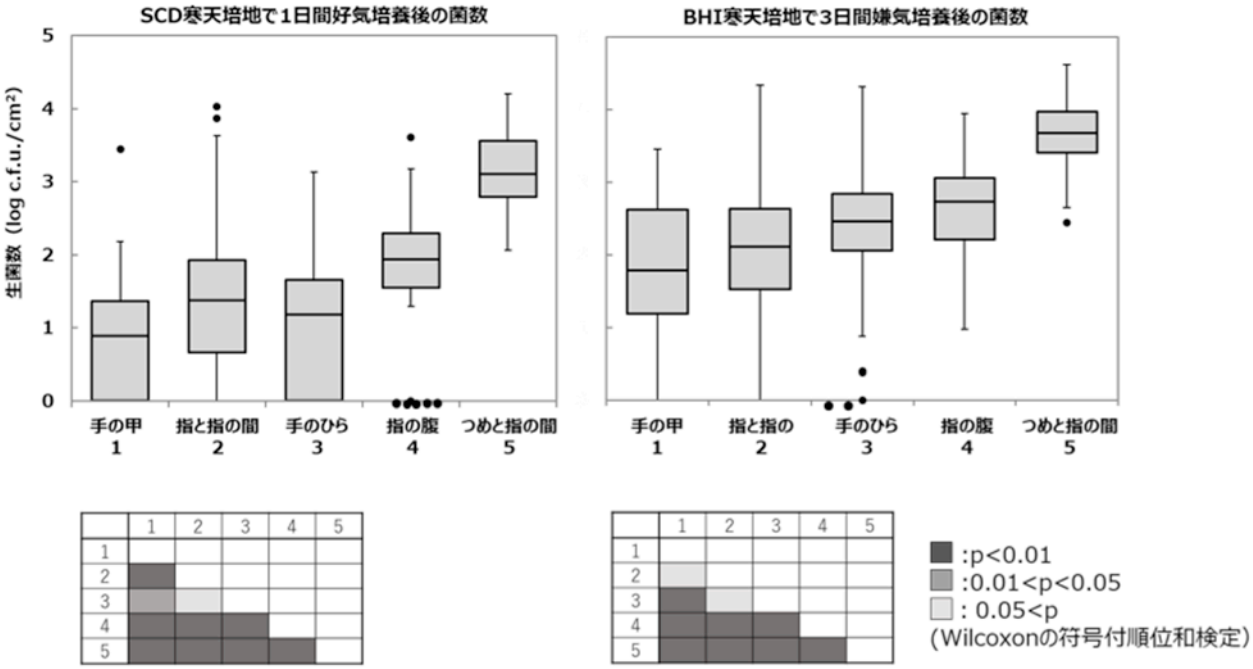


図２　手の各部位ごとの菌数

件で培養した場合のいずれも爪と指の間の菌数が他の部位と比べて多かった（図２）[2)]。部位間で各科の存在比率を見ると、*Propionibacterium* 科等では手の甲で *Staphylococcus* 科等では爪と指の間で他の部位と比べて高かった（in preparation）。また、各部位により肌性状も異なり、手洗い行動や皮膚性状と特定の部位の菌数が関係することも示唆された。

おわりに

上述のベーシックサイエンス研究で得られた知見は、微生物制御技術を必要とする製品開発の一助となってきた。一方、微生物制御技術を開発する段階では、開発しつつある技術の能力を正しく把握する必要があり、そのためには適切な試験法・評価法を採用することが重要である。ベーシックサイエンスで得られた知見と分離した菌株そのものが適切な試験法・評価系の構築においても有用であった。

日用品等の製品開発には、技術開発、処方設計、包装容器設計等において幅広い分野の研究が必要である。本稿では技術開発の中でも微生物制御に関わるベーシックサイエンスについて述べてきたが、各研究分野においてベーシックサイエンス研究がその一端を担うことにより、製品を通して人々の生活や取り巻く環境の未来に貢献できるものと考える。

引用文献

1) 半田拓弥、松村佑太、佐藤惇、今井真美、大野哲、久保田浩美、牧昌孝、柳澤友樹 2016. 衣類の汗臭とその原因菌の解析. 平成 28 年度繊維学会年次大会予稿集, 71: 2E03.

2) 北辻早希、矢野剛久、山本奈緒子、森本拓也、久保田浩美　2019. 一般生活者における効果的な手指衛生を目指した手洗い実態及び肌/細菌状態の解析.　第 34 回日本環境感染学会総会・学術集会予稿集, P182.

3) Kubota, H., Mitani, A., Niwano, Y., Takeuchi, K., Tanaka, A., Yamaguchi, N., Kawamura, Y., and Hitomi, J., 2012. *Moraxella* species are primarily responsible for generating malodor in laundry. Appl. Environ. Microbiol., 78: 3317-3324.

4) Miyahara, Y., Yano, T., Hanai, J., Yokohata, R., Matsuo, S., Hiratsuka, H., Okano, T., and Kubota, H. 2013. Development of novel strategies to control pink biofilms in bathrooms. Bacterial Adherence ＆ Biofilm, 27: 55–58.

5) Takeuchi, K., Hasegawa, Y., Ishida, H., and Kashiwagi, M., 2012. Identification of novel malodour compounds in laundry. Flavour. Fragr. J., 27: 89-94.

6) Yano, T., Kubota, H., Hanai, J., Hitomi, J., and Tokuda, H., 2013. Stress tolerance of *Methylobacterium* biofilms in bathrooms. Microbes Environ., 28: 87-95.

7) Yano, T., Miyahara, Y., Morii, N., Okano, T., Kubota, H. 2016.　Pentanol and benzyl alcohol attack bacterial surface structures differently. Appl. Environ. Microbiol., 82:402-408.

MINI REVIEW

Kameya M [a,b], Arai H [a,b], and Ishii M [a,b]

Metabolic features of hydrogen-oxidizing bacteria and their application to achieve a low-carbon society

水素細菌の代謝特性と低炭素社会実現に向けての展開

[a] 東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻
[b] 東京大学微生物科学イノベーション連携研究機構
亀谷将史 [a,b]、新井博之 [a,b]、石井正治 [a,b]

[a] Department of Biotechnology, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo
[b] Collaborative Research Institute for Innovative Microbiology, The University of Tokyo

Corresponding author: Masafumi Kameya, akameya@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp
Phone: +81-3-5841-5143

Received: March 16, 2020/ Accepted: March 19, 2020

Abstract Hydrogen bacteria, often called hydrogen-oxidizing bacteria or knallgas bacteria, are a bacterial group that autotrophically grows utilizing hydrogen and carbon dioxide as the electron donor and the carbon source, respectively. This article presents an overview of physiological features and central metabolism, including hydrogen oxidation and carbon fixation, of hydrogen bacteria in order to explain what metabolic mechanisms endow the distinct features with these bacteria. We also discuss the potential application of hydrogen bacteria and their advantages to achieve a low-carbon society based on the metabolic features.

Keyword: 水素細菌、独立栄養性、ヒドロゲナーゼ、二酸化炭素固定、カルビン回路、還元的 TCA 回路、低炭素社会、水素社会、ガス発酵生産 (hydrogen-oxidizing bacteria, autotrophy, hydrogenase, carbon fixation, Calvin cycle, rTCA cycle, low-carbon society, hydrogen society, gas fermentation)

1. はじめに

「水素細菌」は、“水素の酸化エネルギーを利用してエネルギー生産を行い、独立栄養的に生育することができる一群の細菌”として生化学辞典で定義されている [43]。

「水素細菌」という言葉を聞いたとき、この定義とは逆に、「水素を生産する細菌」というイメージを持つ人もいるだろう。しかしそのような菌は、「水素細菌」ではなく、「水素生成菌」と呼ばれている。例えば、活性汚泥で有機物を酸化し、共生するメタン生成菌に水素を供給する菌 [44]や、水素生成能を有する嫌気性アーキア [16]などがよく知られている。これらの菌は、嫌気的環境で有機物を酸化し、生じた還元力の最終的な捨て場としてプロトンを H_2 に還元して放出する。またこれ以外に水素を生成する菌としては、窒素固定酵素 nitrogenase の副反応により水素を生じる窒素固定菌も挙げられる [22]。

「水素細菌」はこれらの菌と異なり、「水素酸化細菌」とも呼ばれ、主に好気的環境で水素を水に酸化することでエネルギーを獲得し生育する菌を指す。従属栄養生物は有機物を摂取しエネルギー源としなければ生育できないのに対し、水素細菌は有機物なしで生育することができる。すなわち水素細菌は、水素を唯一のエネルギー源とする能力だけではなく、二酸化炭素を唯一炭素源として固定して独立栄養的に生育する能力も有している。

本稿では水素細菌について、「そもそもどういう菌なのか」といった基本的なことから、菌の特性、またその特性がどのような代謝機構によるものなのかを、できる限り平易に紹介したい。またこうした代謝特性を踏まえた上で、低炭素社会の実現など昨今社会的に求められている課題に水素細菌をどのように活用できるか、その可能性を論じたい。

2. 水素細菌の特性や分類、環境中分布

筆者の所属する研究室では、水素を唯一のエネルギー源、二酸化炭素を唯一の炭素源とした条件で水素細菌のスクリーニングが行われてきた。温泉土壌からは、70℃を至適温度とする *Hydrogenobacter thermophilus* や、50 ℃を至適温度とする *Hydrogenophilus thermoluteolus* といった好熱性水素細菌が単離されている[10, 17]。単離源は陸上淡水環境に限られず、海洋からは *Hydrogenovibrio marinus* といった中温性の水素細菌も得られている[26]。これらの菌株は、ゲノム解読[2-4]をはじめ、その特異な代謝機構の解明を目指した研究が進められている。また一般的に知られる水素細菌としては、中温の土壌から単離された *Ralstonia eutropha* (*Cupriavidus necator*) H16 が代表的な菌株として広く研究されている[29]。

このように様々な環境に遍在する水素細菌であるが、どのような特性を有しているのだろうか。水素細菌を他の独立栄養性生物と比較したとき、その特性の一つとして増殖能の高さが挙げられる[43]。中でも *H. thermoluteolus* は、倍加時間約 1 時間という、独立栄養性生物としては異例の速さで増殖する[10]。

また系統分類上でも広い範囲に分布することも、水素細菌の特徴として挙げられる。上述の菌のうち *H. marinus* は *γ-Proteobacteria*、*R. eutropha* は *β-Proteobacteria*、*H. thermoluteolus* は *Hydrogenophilia* と、*Proteobacteria* 門の各綱に属する。一方グラム陽性菌でも、*Firmicutes* 門に属する *Kyrpidia tusciae*[19] や *Actionobacteria* 門に属する *Mycobacterium llatzerense*[9]などが水素細菌として報告されている。さらに、*H. thermophilus* は *Bacteria* 界でもっとも古くに他から分岐した *Aquificae* 門に属する。このように広範な系統に分布することからも、後述する hydrogenase の研究から支持されるように、水素酸化という代謝様式の生命進化における古さが窺われる。

3. 水素細菌の代謝機構

水素を唯一のエネルギー源、二酸化炭素を唯一の炭素源として生育するという水素細菌の特性はすでに述べたが、ではどのような生物学的機構でこれを可能にしているのだろうか。これに関して、水素酸化代謝と炭酸固定代謝を中心に紹介したい。

3-1. 水素酸化代謝

水素酸化と hydrogenase

「水素をエネルギー源とする」という、水素細菌で最も重要な特性を支えている酵素が hydrogenase である。Hydrogenase は、

$$H_2 \rightleftarrows 2H^+ + 2e^-$$

という反応を可逆的に触媒することで、分子状水素をプロトンに変換し電子を引き抜くことができる。水素細菌はこの反応で得た電子を呼吸鎖などに渡すことで、ATP 合成や各種代謝への還元力供給を行っている。

Hydrogenase の分類と生理学的機能

Hydrogenase が水素酸化に必須であることは述べたが、それでは水素細菌は hydrogenase を 1 つ持っていれば十分なのだろうか。それとも何らかの理由で複数の hydrogenase を使い分けていたりするのだろうか。

細胞内での局在性と生理学的役割によって、hydrogenase は大きく 3 つに分類される。第一のグループは、細胞膜上にある membrane-bound hydrogenase (MBH)である（図 1）。本グループの酵素は膜上でキノンと電子授受することから、呼吸鎖やプロトン膜勾配形成と共役することができる。多くの水素細菌において、ATP 合成に寄与しているのは MBH とされる。第二のグループは soluble hydrogenase (SH)と呼ばれ、細胞質で NAD(P)H などの酸化還元を行う。様々な生体反応で NAD(P)H などの電子供与体が必要とされるが、水素細菌の多くは SH によってこれら電子供与体を供給している。第三のグループは regulatory hydrogenase (RH)と呼ばれる。RH は水素をセンシングし、histidine protein kinase を介して MBH や SH など水素応答性タンパク質の発現を制御する。多くの水素細菌はこれら 3 種の hydrogenase のうち

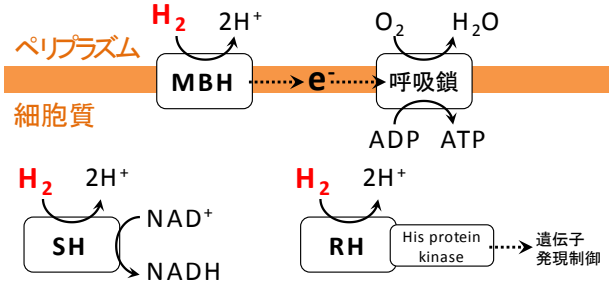


図 1. 水素細菌の hydrogenase の局在と機能。

複数を有し、役割に応じて使い分けている。

上記の分類とは別に、活性中心に配位する金属によっても hydrogenase は分類される。大きくは 3 グループに分けられ、[NiFe]型や[FeFe]型、[Fe]型と呼ばれる [30]。このうち[Fe]型はメタン生成アーキアに特異的とされ、水素細菌は主に[NiFe]型と[FeFe]型を有する。一次配列によってさらに細かいサブグループへと分類され、サブグループ間で異なる機能や役割を有することが知られている [33]。

各種 hydrogenase は水素細菌から精製され、その酵素学的性質や立体構造が明らかにされている [30]。水素細菌は好気環境で旺盛に生育するが、一般に hydrogenase は酸素に弱い酵素であることが知られている。水素細菌由来 hydrogenase の構造の解明により、これら酵素がどのようなメカニズムで比較的高い酸素耐性を有しているかについても理解が進みつつある [31, 32, 45]。

Hydrogenase は普遍的酵素？

水素細菌には欠かせない hydrogenase だが、水素細菌にしか存在しないわけではない。Hydrogenase は水素生成方向の反応も可逆的に触媒するため、水素生成菌でも用いられている。

水素細菌や水素生成菌以外の身近な菌でも、hydrogenase の存在は知られている。例えば大腸菌のゲノム中にも 4 種類の hydrogenase がコードされており、嫌気条件下でフマル酸を電子受容体とした際の水素酸化 [21]やギ酸を電子供与体とした際の水素生成 [5]などに関与している。水素細菌に比べればごく限られた能力ではあるものの、一般的に思われているより多くの生物が実は水素酸化能（・生成能）を有していると言える。

「水素酸化能を有していたとしても、普通の生育環境には水素ガスなどないのだから使いどころがないのではないか」と思う人もいるだろう。大気中に水素分子は、0.5 ppm という微少な濃度でしか存在しない。しかし近年、このような低濃度の水素を酸化する *Streptomyces* 属細菌が発見され [7]、同様の代謝機構を有する生物が環境中に広く分布することも示されている [11]。こうした一連の研究は、菅野氏の日本語総説 [42]に詳しくまとめられている。

このように多くの生物種が hydrogenase を保持していることには、進化的な背景があると考えられる。生命起源については様々な説が提唱されているが、「原始生命はエネルギー源として水素を用いており、そのため生命初期から hydrogenase が用いられていた」とする説も多い [20]。タンパク質の構造を見ても、MBH は呼吸鎖の complex I (NADH dehydrogenase)と類似しており、complex I の進化的起源と推測されている [40]。こうしたことから、hydrogenase は現存生命の共通祖先以前から存在する古い酵素であり、それが多くの現存生物種で保持されている一因と考えられる。水素細菌における hydrogenase の研究は、水素細菌にとどまらず生物普遍的なエネルギー代謝の進化を理解する上でも大きな鍵を握っているのかもしれない。

3-2. 炭酸固定代謝

カルビン回路

シアノバクテリアや植物では、カルビン回路で炭酸固定が行われていることがよく知られている。水素細菌でも *H. thermoluteolus* や *H. marinus*、*R. eutropha* といった菌では、炭酸固定経路としてカルビン回路が機能している [6, 13, 26]。これらの菌においては、光合成生物とも共通の代謝経路で二酸化炭素が固定されていると言える。

カルビン回路の鍵酵素 ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO)は CO_2 を基質とするが、細胞内に十分な濃度の溶存 CO_2 を常に供給するのは困難である。そこでシアノバクテリアなどの光合成細菌は、細胞内に carboxysome と呼ばれる構造体を形成する [36, 41]。RubisCO を carboxysome 内に局在させると共に、内部に CO_2 を濃縮する機構を働かせることで、局所的な CO_2 濃度を上げ炭酸固定効率を高めている（図 2）。また、通常 RubisCO は酸素存在下で oxygenase 反応を触媒し生育に悪影響を与える（光呼吸）が、carboxysome 内に RubisCO を隔離することでこうした反応も抑制できる。

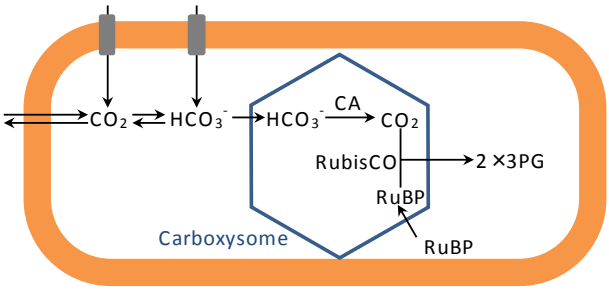


図 2. カルボキシソームによる CO_2 濃縮機構。Carbonic anhydrase (CA)は HCO_3^- と CO_2 とを可逆的に変換する。HCO_3^- はカルボキシソームの殻を通過できるのに対し、CO_2 は通過できずカルボキシソーム内に濃縮される。RuBP, D-ribulose 1,5-bisphosphate。3PG, 3-phosphoglycerate。

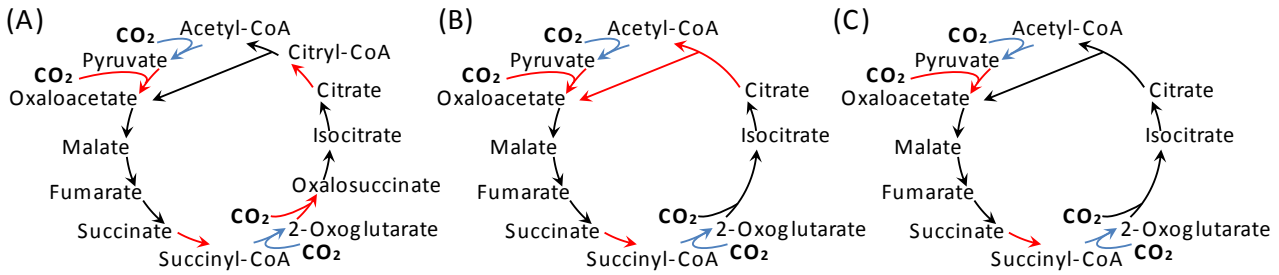


図 3. 水素細菌で知られる rTCA 回路。赤矢印は ATP を消費する酵素反応を示す。青矢印は電子供与体としてフェレドキシンを必要とする酵素反応を示す。 (A) *H. thermophilus* をはじめとする *Aquificae* 門 *Aquificaceae* 科の水素細菌が有する rTCA 回路。(B) *Aquificae* 門 *Hydrogenothermaceae* 科と *Desulfurobacteriaceae* 科の rTCA 回路 [8]。2-Oxoglutarate から isocitrate の生成、citrate から acetyl-CoA + oxaloacetate への開裂がそれぞれ一段階の酵素反応で進み、前者は ATP を消費せずに進行する。(C) *Thermosulfidibacter takaii*（*Aquificae* 門）と *Desulfurella acetivorans*（δ-proteobacteria）の rTCA 回路 [23, 27]。Citrate 開裂反応が ATP 消費なしに進行する。

では水素細菌もこのような CO_2 濃縮機構を有しているだろうか。カルビン回路を有する水素細菌のうち、*H. thermoluteolus* や *R. eutropha* などは carboxysome を形成しない。一方、*H. marinus* は carboxysome 遺伝子を有し、実際に低 CO_2 条件特異的に carboxysome を形成することが確かめられている [39]。さらに本菌では、局在の異なる複数の RubisCO を有し二酸化炭素濃度に応じて使い分けるという、シアノバクテリアにもない機構が見つかっている [34, 35]。

非カルビン回路による炭酸固定

上述の水素細菌とは異なり、カルビン回路を持たない水素細菌も存在する。

H. thermophilus は、カルビン回路の代わりに reductive tricarboxylic acid (rTCA; 還元的 TCA)回路と呼ばれる経路で炭酸固定を行う [1, 14, 24, 38] (図 3A)。rTCA 回路は TCA 回路を逆回転させた経路として知られ、有機物を二酸化炭素に分解する TCA 回路とは逆に、二酸化炭素を取り込んで有機物を合成する。

rTCA 回路は、NADH よりも酸化還元電位が低く強力な電子供与体としてフェレドキシンを必要とする [14, 38]が、少ない ATP 消費で効率的に炭酸固定を行うことができる。例えば 2 分子の CO_2 から 1 分子の acetyl-CoA を合成するのに、カルビン回路では ATP が 7 分子消費されるのに対し、*H. thermophilus* の rTCA 回路では 3 分子しか消費されない [23]。さらに、rTCA 回路を構成する酵素反応ステップは水素細菌によって異なり [8]、上記の反応に ATP を 1 分子しか使わない高エネルギー効率な rTCA 回路も近年発見されている [23, 27]（図 3B, C）。

なお、TCA 回路の変わり種のように思われがちな rTCA 回路であるが、実は rTCA 回路こそが TCA 回路の祖先型代謝という説も唱えられている [37]。また、rTCA 回路は起源も古く、無機炭素から有機物を合成し原始生命に供給していた反応経路とも推定されている [18]。このような代謝が、水素細菌の中でも古い進化的起源を有する *H. thermophilus*（*Aquificae* 門）で機能しているのは、生命進化の観点からも興味深い。

3-3. 水素細菌の中央代謝全体像

上記の水素酸化代謝と炭酸固定代謝を踏まえると、水素細菌の中央代謝を図 4A のように俯瞰的に見ることができる。このような見方をしたとき、エネルギー合成と還元力供給、炭素代謝の 3 つが、互いに独立した関係にあると言える。

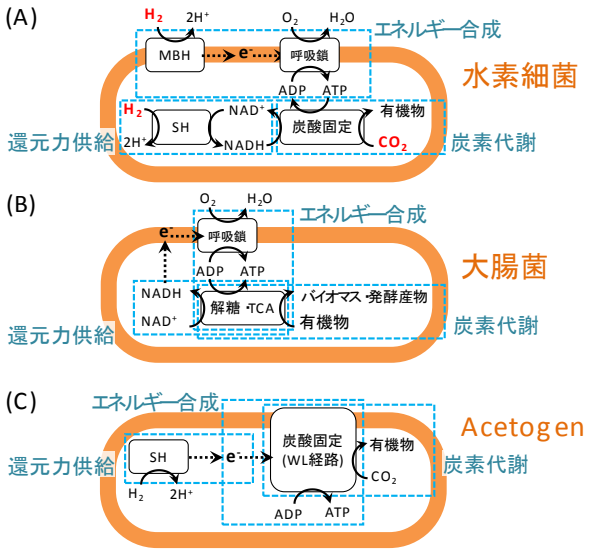


図 4. 各種細菌のエネルギー合成と還元力供給、炭素代謝。水素細菌(A)と大腸菌(B)、acetogen (C)の中央代謝系を示す。Acetogen は Wood-Ljungdahl 経路（WL 経路；別名 acetyl-CoA 経路）で炭酸固定およびエネルギー獲得を行う。

こうした関係性は当たり前のことに聞こえるかもしれないが、実はそうではない。例えば大腸菌で同様の見方をすると、解糖系や TCA 回路のところでこれら 3 つの系が入り交じって重複している（図 4B）。このように、エネルギー合成・還元力供給・炭素代謝が混線せずに独立しているというのは水素細菌の代謝の特徴の一つであり、後述するような応用上の利点・可能性をもたらすと我々は考えている。

3-4. 水素細菌の代謝の柔軟性

水素細菌が一般的な微生物とは異なる環境で生育できることを述べてきたが、必ずしもそうした環境でしか生きられないというわけではない。

例えば多くの水素細菌は、チオ硫酸などの無機化合物も還元力源として利用でき、こうした条件では水素なしで生育できる [28]。また、有機物を資化できる菌も多く、水素や二酸化炭素なしでも有機物存在下では従属栄養的に生育する [25]。さらに、水素細菌が生育できるのは好気環境だけに限られない。嫌気条件では酸素の代わりに硝酸を最終電子受容体とした脱窒などを行い生育できる菌も多い [15]。

このような水素細菌は、電子供与体（水素など）と最終電子受容体（酸素など）を環境に応じて使い分け、柔軟に電子伝達系を切り替えることでエネルギーを獲得していると言える。上述の大腸菌のように水素酸化能を持つ菌が非水素細菌にもいるように、水素細菌らしからぬ環境で生育できる水素細菌も多いのだ。

4. 水素細菌の産業利用

上で述べたような興味深い代謝特性から、水素細菌についての研究は学術的見地から長年行われてきた。しかし近年はそれに加え、社会情勢の変化から、水素細菌の産業利用についても検討されるようになった。

4-1. 社会的背景

水素細菌を産業利用に結びつける一つ目のキーワードは、「低炭素社会」である。2016 年のパリ協定発効をはじめとした世界的な取り組みとして、二酸化炭素などの温室効果ガス排出の大幅な削減が求められていることは説明の必要がないだろう。古くは「脱石油」として可食部バイオマスや非可食部バイオマスの利用が推進されてきたが、さらなる持続可能性向上のため、二酸化炭素など無機炭素の資源化が今日では不可欠とされている。こうした資源化を自然界で実際に行っているのが、水素細菌をはじめとする独立栄養性生物である。

もう一つのキーワードは、「水素社会」である。2017 年に政府が水素基本戦略を決定するなど、化石燃料から水素へのシフトが国を挙げて推進されている。2014 年に策定されたロードマップでは水素社会実現までの期間を 3 つのフェーズに分けているが、興味深いことにフェーズ 1 として掲げられたのは「水素の大量製造・供給」などではなく、「水素利用の飛躍的拡大」である。これは、「とりあえず水素をたくさん作ってから使い道を考える」のではなく、「水素を使うことでこういうことが可能になる、という新たな価値をまず創出し、それを原動力に水素社会化を進める」という戦略に根ざしたものであろう。

これら 2 つのキーワードで表されるニーズに対し、バイオでどう応えるかは生物工学に携わる研究者に課せられた使命と言えよう。上記の水素基本戦略では、「水素と二酸化炭素を利用した革新的化学品合成方法」が必要な技術開発の一つとして挙げられている。もし水素細菌を宿主とし、水素と二酸化炭素を原料として物質生産ができれば、求められている技術としてぴたりと当てはまるだろう。

4-2. ガス発酵生産の潮流

このように水素細菌の利用が期待される一方で、「水素や二酸化炭素などガスを原料とした発酵生産なんて現実的にあり得るのか」という疑念を持つ人もいるだろう。そこで、実はこうした取り組みは gas fermentation と呼ばれ、すでに世界中の企業で行われていることを示す事例を簡単に紹介したい。

ガス状の水素や無機炭素（CO_2 と CO）を原料とした物質生産を行っている企業としては、アメリカの LanzaTech 社や、ドイツの Evonik 社と Siemens 社 [12] などが知られている。これらの企業では、*Clostridium* 属の嫌気性酢酸生成菌（acetogen）を用い、エタノールやブタノールなどの有機溶媒を生産している。

こうした物質生産で使用されるのは acetogen だけにとどまらず、水素細菌も用いられている。国内の企業では、CO2 資源化研究所が水素・二酸化炭素からのイソブタノール生産などに成功している [46]。また東京大学においても、水素細菌に外来遺伝子を導入することで乳酸生産を行えること、また電気化学的に還元力を与えることで生産量が飛躍的に増加することなどを示している（木村ら, unpublished）。

ガスを原料とした発酵生産は、化合物生産に限られない。アメリカの CALYSTA 社やデンマークの

Unibio 社は、メタンを原料として好気性メタン酸化菌を培養し、得られた菌体を家畜飼料化している。こうした事業は、微生物菌体が飼料として高い価値（高タンパク質含量と良好な必須アミノ酸バランス）を備えている点に着目したものである。国内でも、2019 年に水産庁の養殖業成長産業化推進事業で「水素細菌を原料とする純国産養魚飼料開発」が採択されるなど、水素細菌の飼料としての活用を目指した産学官連携プロジェクトを進めている。

4-3. 物質生産における水素細菌の特長

物質生産に水素細菌を利用するメリットとしては、CO_2 と CO、CH_4 といった無機炭素を原料とし、カーボンニュートラル・クリーンな物質生産ができることがまず挙げられる。このメリットはガス発酵生産で用いられる他の菌とも共通するが、そうした独立栄養性生物と比較して高い増殖能を示すことは水素細菌ならではの特長と言える。

水素細菌の培養には必ずしも高濃度のガスを必要とせず、爆発限界（約 4%）以下の水素濃度、1%以下の二酸化炭素濃度でも大きな生育遅延なしに培養できることを我々は確認している（宮野ら, unpublished）。化学触媒法など高濃度・高純度のガスを必要とする手法と異なり、安価な低純度ガスや排ガスが利用できることも期待される。

エネルギー合成・還元力供給・炭素代謝が独立しているという性質も、水素細菌で物質生産を行う上で有利な点だと我々は考えている（図 4）。大腸菌で発酵生産を行う場合を考えると、炭素代謝を改変したときに、酸化還元やエネルギー合成のバランスが崩れてしまうことが往々にして起きる。例えば、物質生産や菌の生存に必要な ATP を合成するためにエネルギー合成系が動くと、重複している炭素代謝も動いてしまい、必然的に収率の低下や副生成物の蓄積が起きてしまう。同様に、還元力が足りないときや余剰となるときもそのバランスを取るため炭素代謝が動き、収率低下や副生成物蓄積につながる。水素細菌と同様にガス発酵生産に用いられる acetogen においても、こうした代謝系の重複が見られ、同じ問題が起こりうる。一方、水素細菌ではこれらが独立しており、エネルギーが足りない分は MBH が、還元力が足りない分は SH が自由に動き、水以外の副生成物を生じない。すなわち、目的生成物が酸化的な化合物であろうが還元的な化合物であろうが、また合成過程でエネルギーコストがどれだけかかる化合物であろうが、副生成物の蓄積などを起こさないという、物質生産ホストとして高いポテンシャルを有している。

5. 終わりに

本総説では、水素細菌の特性や代謝のあらましを概説し、産業利用上どのような可能性を有しているかを紹介した。「水素細菌」という言葉自体、認知度はあまり高くなく、ニッチな研究対象の重箱の隅をつついているようなイメージを持たれるかもしれない。しかしその代謝を詳細に調べていくと、他の独立栄養性生物や生物全般に共通する生体機構、また生命の進化についてヒントとなるものまでが見えてくる。水素細菌に限った話ではないが、こうした菌の代謝研究の魅力ではないかと思っている。

水素細菌の産業利用について、本稿では「低酸素社会」など昨今のキーワードに沿って紹介した。しかしその土台になっているのは、こうした言葉が生まれる前から地道に水素細菌の性状を明らかにしてきた先人の研究結果である。今後も、「水素細菌って面白いかも」と思う研究者が続き、水素細菌の新たな可能性を見出す研究が盛り上がっていくことが望まれる。本総説がそのきっかけになれば幸いである。

引用文献

1) Aoshima M. 2007. Novel enzyme reactions related to the tricarboxylic acid cycle: phylogenetic/functional implications and biotechnological applications. Appl Microbiol Biotechnol 75:249-255.

2) Arai H, Ishii M. 2019. Complete genome sequence of a mesophilic obligately chemolithoautotrophic hydrogen-oxidizing bacterium, *Hydrogenovibrio marinus* MH-110. Microbiol Resour Announc 8:e01132-19.

3) Arai H, Kanbe H, Ishii M, Igarashi Y. 2010. Complete genome sequence of the thermophilic, obligately chemolithoautotrophic hydrogen-oxidizing bacterium *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. J Bacteriol 192:2651-2652.

4) Arai H, Shomura Y, Higuchi Y, Ishii M. 2018. Complete genome sequence of a moderately thermophilic facultative chemolithoautotrophic hydrogen-oxidizing bacterium, *Hydrogenophilus*

thermoluteolus TH-1. Microbiol Resour Announc 7:e00857-18.

5) Bagramyan K, Trchounian A. 2003. Structural and functional features of formate hydrogen lyase, an enzyme of mixed-acid fermentation from *Escherichia coli*. Biochemistry (Moscow) 68:1159-1170.
6) Bowien B, Kusian B. 2002. Genetics and control of CO_2 assimilation in the chemoautotroph *Ralstonia eutropha*. Arch Microbiol 178:85-93.
7) Constant P, Poissant L, Villemur R. 2008. Isolation of *Streptomyces* sp. PCB7, the first microorganism demonstrating high-affinity uptake of tropospheric H_2. ISME J 2:1066.
8) Giovannelli D, Sievert SM, Hügler M, Markert S, Becher D, Schweder T, Vetriani C. 2017. Insight into the evolution of microbial metabolism from the deep-branching bacterium, *Thermovibrio ammonificans*. eLife 6:e18990.
9) Gomila M, Ramirez A, Gasco J, Lalucat J. 2008. *Mycobacterium llatzerense* sp. nov., a facultatively autotrophic, hydrogen-oxidizing bacterium isolated from haemodialysis water. Int J Syst Evol Microbiol 58:2769-2773.
10) Goto E, Kodama T, Minoda Y. 1977. Isolation and culture conditions of thermophilic hydrogen bacteria. Agric Biol Chem 41:685-690.
11) Greening C, Biswas A, Carere CR, Jackson CJ, Taylor MC, Stott MB, Cook GM, Morales SE. 2016. Genomic and metagenomic surveys of hydrogenase distribution indicate H_2 is a widely utilised energy source for microbial growth and survival. ISME J 10:761-777.
12) Haas T, Krause R, Weber R, Demler M, Schmid G. 2018. Technical photosynthesis involving CO_2 electrolysis and fermentation. Nature Catalysis 1:32-39.
13) Hayashi NR, Ishida T, Yokota A, Kodama T, Igarashi Y. 1999. *Hydrogenophilus thermoluteolus* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, facultatively chemolithoautotrophic, hydrogen-oxidizing bacterium. Int J Syst Evol Microbiol 49:783-786.
14) Ikeda T, Yamamoto M, Arai H, Ohmori D, Ishii M, Igarashi Y. 2010. Enzymatic and electron paramagnetic resonance studies of anabolic pyruvate synthesis by pyruvate: ferredoxin oxidoreductase from *Hydrogenobacter thermophilus*. FEBS J 277:501-510.
15) Kameya M, Kanbe H, Igarashi Y, Arai H, Ishii M. 2017. Nitrate reductases in *Hydrogenobacter thermophilus* with evolutionarily ancient features: distinctive localization and electron transfer. Mol Microbiol 106:129-141.
16) Kanai T, Imanaka H, Nakajima A, Uwamori K, Omori Y, Fukui T, Atomi H, Imanaka T. 2005. Continuous hydrogen production by the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. J Biotechnol 116:271-282.
17) Kawasumi T, Igarashi Y, Kodama T, Minoda Y. 1980. Isolation of strictly thermophilic and obligately autotrophic hydrogen bacteria. Agric Biol Chem 44:1985-1986.
18) Kitadai N, Kameya M, Fujishima K. 2017. Origin of the reductive tricarboxylic acid (rTCA) cycle-type CO_2 fixation: a perspective. Life 7:39.
19) Klenk HP, Lapidus A, Chertkov O, Copeland A, Del Rio TG, Nolan M, Lucas S, Chen F, Tice H, Cheng JF, Han C, Bruce D, Goodwin L, Pitluck S, Pati A, Ivanova N, Mavromatis K, Daum C, Chen A, Palaniappan K, Chang YJ, Land M, Hauser L, Jeffries CD, Detter JC, Rohde M, Abt B, Pukall R, Goker M, Bristow J, Markowitz V, Hugenholtz P, Eisen JA. 2011. Complete genome sequence of the thermophilic, hydrogen-oxidizing *Bacillus tusciae* type strain (T2) and reclassification in the new genus, *Kyrpidia* gen. nov. as *Kyrpidia tusciae* comb. nov. and emendation of the family *Alicyclobacillaceae* da Costa and Rainey, 2010. Stand Genomic Sci 5:121-134.

20) Lane N, Martin William F. 2012. The origin of membrane bioenergetics. Cell 151:1406-1416.

21) Macy J, Kulla H, Gottschalk G. 1976. H_2-dependent anaerobic growth of *Escherichia coli* on L-malate: succinate formation. J Bacteriol 125:423-428.

22) Madamwar D, Garg N, Shah V. 2000. Cyanobacterial hydrogen production. World Journal of Microbiology and Biotechnology 16:757-767.

23) Mall A, Sobotta J, Huber C, Tschirner C, Kowarschik S, Bačnik K, Mergelsberg M, Boll M, Hügler M, Eisenreich W, Berg IA. 2018. Reversibility of citrate synthase allows autotrophic growth of a thermophilic bacterium. Science 359:563-567.

24) Miura A, Kameya M, Arai H, Ishii M, Igarashi Y. 2008. A soluble NADH-dependent fumarate reductase in the reductive tricarboxylic acid cycle of *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. J Bacteriol 190:7170-7177.

25) Nguyen HT, Hirano S-i, Arai H, Nishihara H, Ishii M. 2017. Transcriptome profiles of central carbon metabolism under autotrophic, heterotrophic, and mixotrophic conditions in *Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1. J Jpn Soc Extremophiles 16.

26) Nishihara H, Igarashi Y, Kodama T. 1991. *Hydrogenovibrio marinus* gen. nov., sp. nov., a marine obligately chemolithoautotrophic hydrogen-oxidizing bacterium. Int J Syst Evol Microbiol 41:130-133.

27) Nunoura T, Chikaraishi Y, Izaki R, Suwa T, Sato T, Harada T, Mori K, Kato Y, Miyazaki M, Shimamura S, Yanagawa K, Shuto A, Ohkouchi N, Fujita N, Takaki Y, Atomi H, Takai K. 2018. A primordial and reversible TCA cycle in a facultatively chemolithoautotrophic thermophile. Science 359:559-563.

28) Sato Y, Kanbe H, Miyano H, Sambongi Y, Arai H, Ishii M, Igarashi Y. 2012. Transcriptome analyses of metabolic enzymes in thiosulfate- and hydrogen-grown *Hydrogenobacter thermophilus* cells. Biosci Biotechnol Biochem 76:1677-1681.

29) Schlegel HG, Gottschalk G, Von Bartha R. 1961. Formation and utilization of poly-β-hydroxybutyric acid by knallgas bacteria (*Hydrogenomonas*). Nature 191:463-465.

30) Shima S, Pilak O, Vogt S, Schick M, Stagni MS, Meyer-Klaucke W, Warkentin E, Thauer RK, Ermler U. 2008. The crystal structure of [Fe]-hydrogenase reveals the geometry of the active site. Science 321:572-575.

31) Shomura Y, Taketa M, Nakashima H, Tai H, Nakagawa H, Ikeda Y, Ishii M, Igarashi Y, Nishihara H, Yoon K-S, Ogo S, Hirota S, Higuchi Y. 2017. Structural basis of the redox switches in the NAD^+-reducing soluble [NiFe]-hydrogenase. Science 357:928-932.

32) Shomura Y, Yoon KS, Nishihara H, Higuchi Y. 2011. Structural basis for a [4Fe-3S] cluster in the oxygen-tolerant membrane-bound [NiFe]-hydrogenase. Nature 479:253-256.

33) Sondergaard D, Pedersen CN, Greening C. 2016. HydDB: A web tool for hydrogenase classification and analysis. Sci Rep 6:34212.

34) Toyoda K, Ishii M, Arai H. 2018. Function of three RuBisCO enzymes under different CO_2 conditions in *Hydrogenovibrio marinus*. J Biosci Bioeng 126:730-735.

35) Toyoda K, Yoshizawa Y, Arai H, Ishii M, Igarashi Y. 2005. The role of two CbbRs in the transcriptional regulation of three ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase genes in *Hydrogenovibrio marinus* strain MH-110. Microbiology 151:3615-3625.

36) Turmo A, Gonzalez-Esquer CR, Kerfeld CA. 2017. Carboxysomes: metabolic modules for CO_2 fixation. FEMS Microbiol Lett 364:fnx176.

37) Verschueren KHG, Blanchet C, Felix J, Dansercoer A, De Vos D, Bloch Y, Van Beeumen J, Svergun D, Gutsche I, Savvides SN, Verstraete K. 2019. Structure of ATP citrate lyase and the origin of citrate synthase in the Krebs cycle. Nature 568:571-575.

38) Yamamoto M, Ikeda T, Arai H, Ishii M, Igarashi Y. 2010. Carboxylation reaction catalyzed by 2-oxoglutarate:ferredoxin oxidoreductases from *Hydrogenobacter thermophilus*. Extremophiles 14:79-85.

39) Yoshizawa Y, Toyoda K, Arai H, Ishii M, Igarashi Y. 2004. CO_2-responsive expression and gene organization of three ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase enzymes and carboxysomes in *Hydrogenovibrio marinus* strain MH-110. J Bacteriol 186:5685-5691.

40) Yu H, Wu C-H, Schut GJ, Haja DK, Zhao G, Peters JW, Adams MWW, Li H. 2018. Structure of an ancient respiratory system. Cell 173:1636-1649 e16.

41) 小川晃男. 1997. ラン藻における CO_2 濃縮と H^+輸送. 化学と生物 35:269-273.

42) 菅野 学. 2017. 地球規模の大気水素循環に重要な役割を果たす鍵微生物群の発見と生理生態学的特性:超低濃度の水素を酸化可能な新規ヒドロゲナーゼをもつ植物共生放線菌. 化学と生物 55:587-589.

43) 大島泰郎, 今堀和友, 山川民夫. 2007. 生化学辞典, 第 4 版 ed. 東京化学同人.

44) 中村浩平, 鎌形洋一. 2005. Recent topics on methanogenic syntrophs. J Environ Biotechnol 5:81-89.

45) 天尾 豊. 2012. 結晶構造解析から見えてきた酸素耐性ヒドロゲナーゼの鉄-硫黄クラスターの仕組み. 生物工学会誌 90:591.

46) 湯川英明, 大谷直人, 石井正治. 2018. ヒドロゲノフィラス属細菌形質転換体 特許 6450912

MINI REVIEW

Umetsu M

Machine-learning-guided molecular evolution of functional protein

機械学習の試行設計によるタンパク質のスマート進化

[1] 東北大学大学院工学研究科
[2] 理化学研究所革新知能統合研究センター
梅津 光央

1Graduate School of Engineering, Tohoku University, 6-6-11 Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-8579, Japan
2Center for Advanced Intelligence Project, RIKEN, 1-4-1 Nihombashi, Chuo-ku, Tokyo 103-0027, Japan

Corresponding Author: Mitsuo Umetsu, mitsuo@tohoku.ac.jp
Phone: +81-22-795-7274, Fax: +81-22-795-7276

Received: March 16, 2020; /Revised: March 23, 2020 / Accepted: March y 24, 2020

Abstract Molecular evolution based on mutagenesis is widely used in protein engineering, where critical amino acid residues of a target protein are identified based on available structural information and mutated for function alteration and maturation. In iterative saturation mutagenesis (ISM), one of the principal molecular evolution methods, mutagenesis proceeds in a step-wise manner: however, ISM does not always lead to the optimal sequence, because the effects of mutations on function are often synergistic or antagonistic. Here, we propose a novel approach that combines molecular evolution with machine learning. In this approach, we iterated mutagenesis, following machine-learning guidance: a Gaussian process is trained with a last small library to propose the next-round mutagenesis library. This enables to prepare a small library suited for screening experiments with high enrichment of functional proteins. A first library of variants was generated, and the sequence and functional data acquired from the variants in the library were used for training a machine-learning model to create the second-round library. The library containing the positive candidate variants predicted by machine-learning are analyzed, and the data are used for training a machine-learning model again. We show the potential of our approach as a powerful platform for accelerating the discovery of functional proteins fluorescent in the case of fluorescence protein and enzyme.

Keyword: 人工知能, 機械学習, 進化分子工学, 変異, タンパク質 (artificial intelligence, machine-learning, molecular evolution, mutagenesis, protein)

はじめに

タンパク質の設計とは、「20 種類のアミノ酸をどう並べるか」という非常に簡単なものである。このアミノ酸配列に従って、アミノ酸が脱水縮合して形成したポリペプチドは立体構造を形成し、その立体構造に起因した機能が創出される。しかし、「20 種類のアミノ酸をどう並べるか」という設計は、未だ「言うは易く行うは難し」である。その理由は、アミノ酸配列がうみだす「場合の数(配列空間)」は膨大であり、さらにポリペプチドのアンフォールド・フォールド構造間のエネルギー差は水素結合数個分の差しかないことが多く、その小さい差を設計しながら膨大な配列空間を探索しなければならないためである。

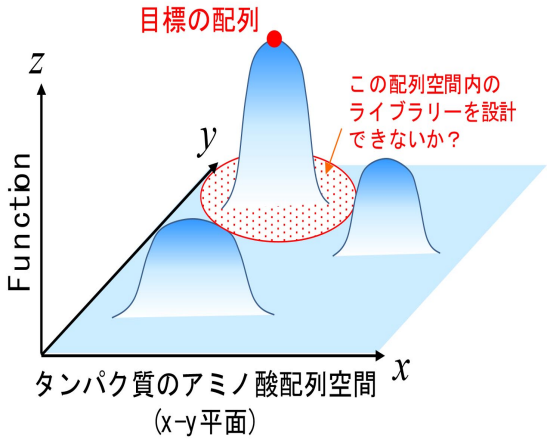


図 1.アミノ酸の配列がつくる配列空間とライブラリー設計

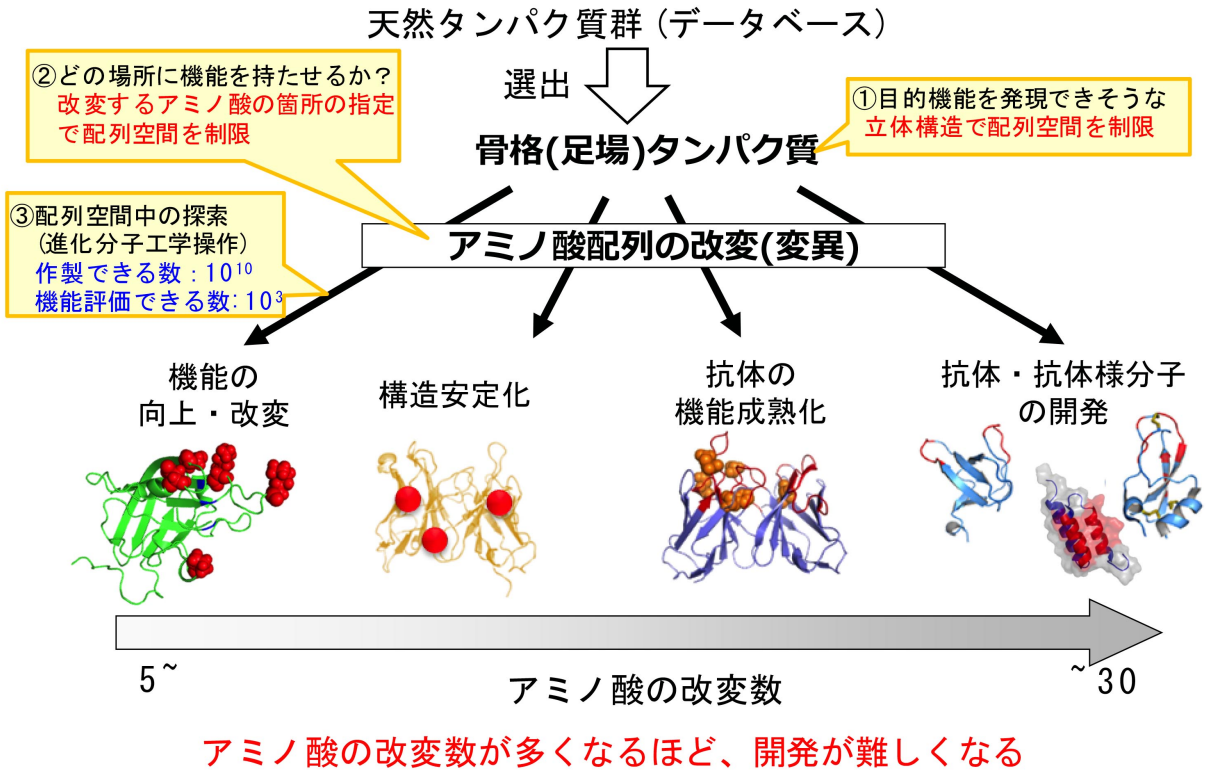


図 2. 配列空間の限定化と進化分子工学

タンパク質工学 [15]が提唱されて 30 年以上経た現在、タンパク質へ変異導入し作製した変異体群のライブラリーから選択圧をかけて目的機能をもつタンパク質を取得する進化分子工学は、現在のタンパク質研究には欠かせない技術である。タンパク質の構造と機能の情報化は、合理的な変異導入によるタンパク質の機能改変へ大きな一歩を与え、変異を導入する残基をある程度合理的に限定することを可能としつつあり [5,8,18]、ライブラリー作製技術も 10^{10} 程度まで調製できるようになってきた現在では、進化分子工学の黎明期とは隔世の感がある確率でタンパク質の機能創出を可能としている。しかし、10^{10} 程度までと言ってもせいぜい 8 残基をランダムに変異させれば飽和してしまう規模である。また、タンパク質の機能を評価するスクリーニング技術は、作製できるライブラリーに見合った規模を簡便・迅速に行うことは難しく、規模の増加とともにそれなりの設備と資金を必要することが多い [6]。そのため、目的機能をもつタンパク質の取得確率は、誰もが気軽に行えるまでには至っていない。

そのため、現在の進化分子工学の一つの流れとして、「目的機能をもつアミノ酸配列を含む確率が高い配列空間を設計する」というものがある(図 1)。著者らは、そのような配列空間の設計に人工知能技術の

ひとつである機械学習を利用して、機能的に陽性な変異体を高密度に含む小規模なタンパク質のライブラリー(スマートホットライブラリー)を設計し、汎用性が高く効率的かつ確実に目的タンパク質へと進化できる進化分子工学の構築を行っている。

機械学習を用いた配列空間の限定

一般的に行われているタンパク質の進化分子工学出しそうな立体構造をもつ足場タンパク質を選び、その足場タンパク質の特定残基位置へ変異を導入したライブラリーから目的機能をもった変異体をスクリーングしていく(図 2)。この操作を配列空間で考えると、立体構造の観点と変異を導入する残基位置の数で配列空間を限定し、その配列空間の中の変異体を探索していることになる。現在までに、タンパク質の立体構造やバイオインフォマティクスを用いたライブラリー設計が行われており [4,9]、無作為な設計と比較して、目的変異体の取得確率と効率が向上しつつある。しかし、まだ対象となる配列空間が広く最適解に近い変異体が存在する確率が高くない。その背景の中、著者らは、さらに人工知能技術の一つである機械学習を取り入れることによって、陽性変異体の存在確率を高めかつ小規模なライブラリー(スマートホットライブラリー)を設計し、大規模なスクリーニングを必要としないタンパク質進化工学プロセスを開発している。この手法では、まず、対象となる配列空間の中で、できるだけまばらに存在する変異体群の配列と機能の相関データを取得する(図 3 中の Step1)。そして、その相関データを学習データとして機械学習を行い、配列空間中の全変異体に対する機能順位をつけ、その上位変異体群をスマートホットライブラリーとして、また機能評価と機械学習を繰り返していくことで最適解をもつ変異体へ近づいていく(図 3 の Step2)。

機械学習に必要な学習データの作成

あるタンパク質の機能を変えるためには、「どこの残基」を「何のアミノ酸」に変えるか、という設計が必要である。このうち、私たちの機械学習を組み合わせた進化分子工学では、「どこの残基」の設計による配列空間の限定は既存の技術・情報を利用し、その限定された配列空間中で「何のアミノ酸」の最適解を迅速・確実に探索していく。

機械学習などの人工知能の利用には、まず人工知能が学習するデータ(学習データ)が必要である。著者らの手法では、学習されるデータとして、変異体のアミノ酸配列とその変異体の機能の紐づけデータをウェット実験で作成しているが、学習データは数値化されている必要がある。今回の場合、アミノ酸を数値化する必要があるが、すでに特徴量として多数の提案がなされている [16]。この数値化は、物理化学特性, 構造, 置換頻度などを主成分分析などで記述子化したものであるが、どの特徴量が良いかはタンパク質によって異なってくる。そのため、学習データ内で最も機能の高い変異体の探索を複数の特徴量を使って行い最も収束速度が速い特徴量を選択するなどして、用いる特徴量を選択する必要がある。

次に、学習データの「量」と「質」の検討が必要である。「量」は全データ数であり、「質」はデータに含まれる陽性データ数である。ここでの陽性とは、若干でも明らかに目的機能をもつ変異体のことである。データ数も陽性データも多いに越したことはな

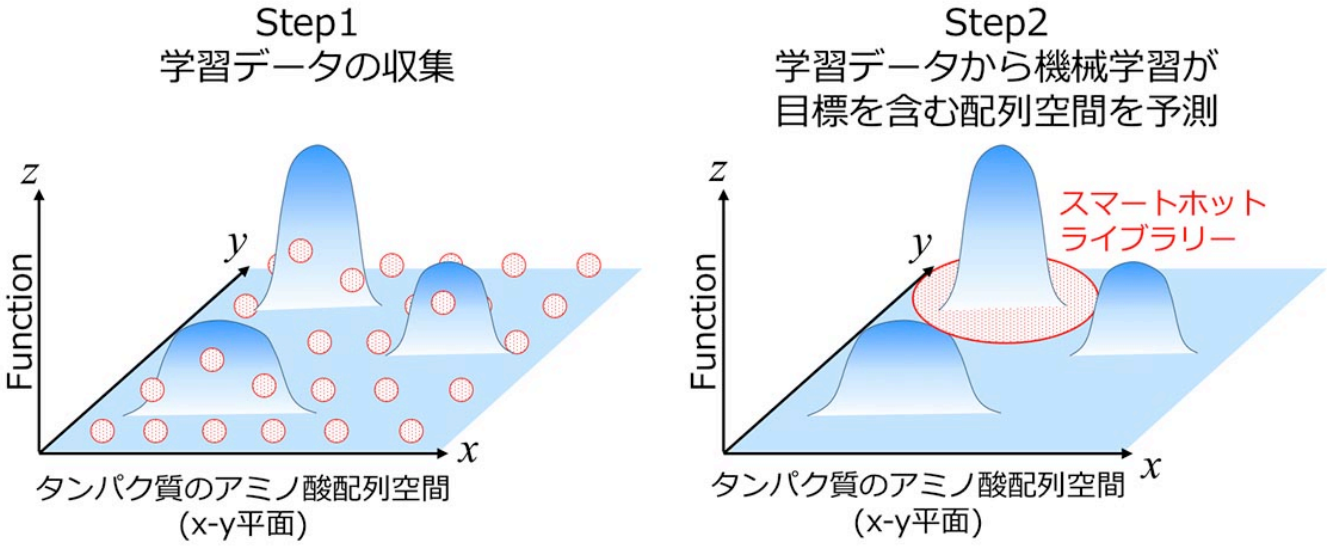


図 3. 機械学習を組み入れた進化分子工学

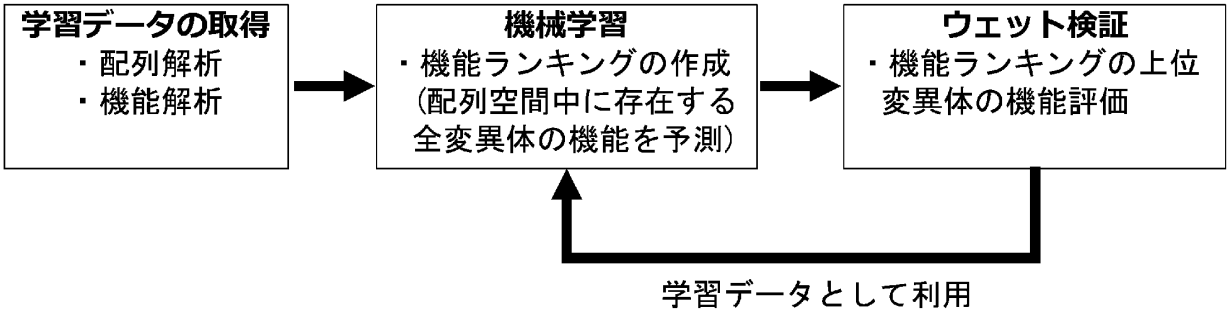


図 4. 機械学習を用いたライブラリー設計とその検証

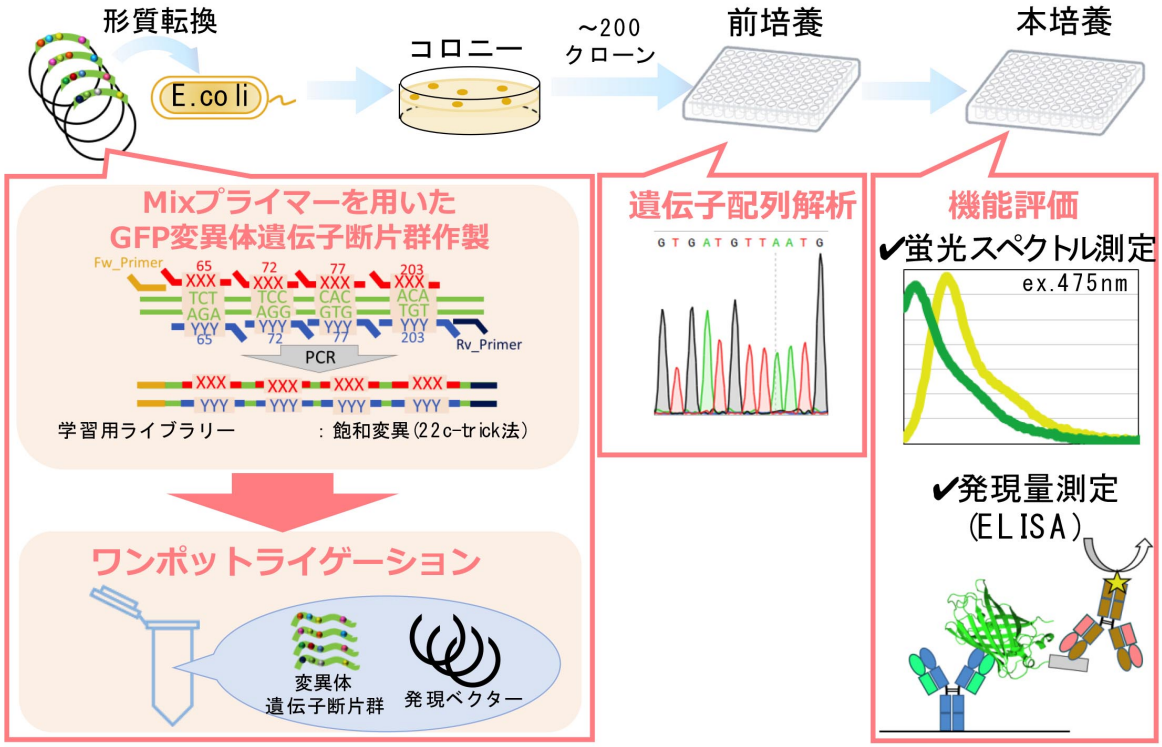


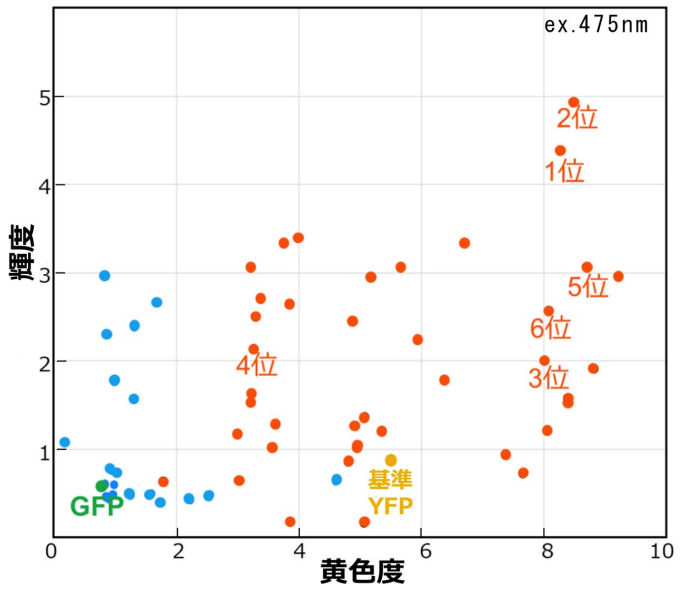
図 5. 迅速なライブラリー作製とデータ収集プロセス

いが、アミノ酸配列と紐づけする機能データは、ウェット実験で取得するので、データ数の多さはデータ作成の労力と時間を増大させる。しかし、陽性データ数がゼロのデータでは、もちろん人工知能は学習することはできない。そのため、学習データを収集する時には、AI に対応した時間軸で収集可能な「量」でありながら学習可能な「質」をもつデータを収集することを考える必要がある。

機械学習による機能配列予測と検証

学習データを取得した後は、そのデータに基づいた機械学習の結果が示す有望な変異体を作製し検証を行う工程を進めていくことで目的解をもつアミノ酸配列を同定していく(図 4)。

著者らは、この手法を用いて、緑色蛍光タンパク質(GFP)を一度の機械学習で黄色化させている [10]。この研究では、GFP と基準黄色蛍光タンパク質(YFP)の配列を比較し、蛍光色の決定に関与の可能性がある 4 残基 [1-3,11-13] に限定した配列空間で行っている。しかし、それでも配列空間の規模は 16 万($20^4=1.6\times10^5$)であり、すべての変異体を作製し評価することは難しい系である。著者らはまず、1 残基へ効率的に飽和変異を導入できる 22c-trick 法 [7]を応用して、各残基位置での 1 飽和変異と 4 残基を同時に飽和変異させた 200 程度の変異体群の作製と遺伝子配列解析・機能評価を最短 5 日で行える系を構築し、153 種の GFP 変異体に対して、変異情報と共に蛍光の黄色度と蛍光強度を収集した(図 5)。その結果、



	学習用ライブラリー	機械学習提案ライブラリー
Total	155	63
黄色	4	44
緑	19	4
消光	132	15
陽性率 ※黄色変異体率	3%	70%

図 6. GFP の黄色化実験における学習用ライブラリー(水色)と機械学習提案ライブラリー(橙)の比較。数値は機械学習でのランキング順位を示す。

弱いながらも黄色蛍光を発する変異体が 3 種含まれる学習データを得た(図 6 中の水色)。

この学習データの陽性率は、基準 YFP を含めても 3%程度であったが、ベイズ最適化を用いた高速な機械学習ソフトウェアである COMBO[17]を用いて「より黄色く・より明るい変異配列」を目標として機械学習し空間配列中の全変異体(16 万)の順位付けを行ったところ、モデル YFP が上位 1%(1313 位)に入った。この結果から、学習用データ中の陽性変異体の存在率が 3%程度であっても、機械学習結果は有効であることが示唆された。

そこで次に、機械学習で提案された変異体ランキング中の高機能な上位変異体群だけからなるスマートホットライブラリーを調製し、機能評価を行った。その結果、学習用データに用いた変異体群と比較して、黄色蛍光を示す変異体の存在率が 70%程度まで大幅に増加しており(図 6 中の橙色)、基準 YFP を超える黄色蛍光を示す変異体も数多くあった。

機械学習で提案された変異体群の配列を見ると、上位 78 位の変異体までは各残基で推測されたアミノ酸の特徴に偏りがあった。そこで既報のデータから検討したところ、各残基において黄色蛍光を示すことが報告されているアミノ酸が多くランキングされていた。さらに、上位 2 位の変異体はこれまで報告されている YFP の中で最も強い黄色蛍光を示す Venus であることも分かり、機械学習から提案されたスマートホットライブラリーは最適解を含む変異体群になる可能性があると言える。

まとめ

あるタンパク質の機能を向上・改変する場合に必要なことは、「どこの残基」を「何のアミノ酸」にするか、という設計である。本論文では、このうち、「何のアミノ酸」にするかに対して機械学習の有効性を説明した。同じアプローチは、進化分子工学でノーベル化学賞を受賞した Arnold のグループも報告しており [17]、進化分子工学の新しい潮流が始まりつつある。

機械学習と連携させた進化分子工学の研究を通して感じていることは、学習させるデータの重要性である。機械学習はデータを与えれば何かしらの結果は出してくれる。しかし、データ量が多くても、誤差が大きく陰性と陽性の区分があいまいなデータでは正しい答えは出してくれない。今後、より正確で高効率な学習データの取得方法が求められてくると考えている。

謝辞

本論文の主要な内容は、東京大学の津田宏治教授および産業総合技術研究所の亀田倫史・齋藤裕主任研究員と共に行った研究成果を元にしたものです。心より御礼申し上げます。

引用文献

1) Biteen J.S., Thompson M.A., Tselentis, N.K., Bowman G.R., Shapiro L., and Moerner, W.E. 2008. Super-resolution imaging in live

Caulobacter crescentus cells using photoswitchable EYFP. Nat. Methods 5:947−949.

2) Crameri A., Whitehorn E.A., Tate E., and Stemmer W.P. 1996. Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. Nat. Biotechnol. 14: 315−319.
3) Dickson R.M., Cubitt A.B., Tsien R.Y., and Moerner, W.E. 1997. On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein. Nature 388:355−358.
4) Engqvist M.K., McIsaac R.S., Dollinger P., Flytzanis N.C., Abrams M., Schor S., and Arnold F.H. 2015. Directed evolution of Gloeobacter violaceus rhodopsin spectral properties. J. Mol. Biol. 427:205-220.
5) Geng F., Ma C.W., and Zeng A.P. 2017. Reengineering substrate specificity of E. coli glutamate dehydrogenase using a position-based prediction method. Biotechnol. Lett. 39:599–605.
6) Karamitros C.S. and Konrad M. 2016. Fluorescence-activated cell sorting of human l-asparaginase mutant libraries for detecting enzyme variants with enhanced activity. ACS. Chem. Biol. 11:2596-2607.
7) Kille S., Acevedo-Rocha C.G., Parra L.P., Zhang Z.G., Opperman D.J., Reetz M.T., and Acevedo J.P. 2013. Reducing codon redundancy and screening effort of combinatorial protein libraries created by saturation mutagenesis. ACS Synth. Biol. 2:83-92.
8) Liu M.D., Warner E.A., Morrissey C.E., Fick C.W., Wu T.S., Ornelas M.Y.., Ochoa G.V., Zhang B.S., Rathbun C.M., Porterfield W.B., Prescher J.A., and Leconte A.M. 2018. Statistical coupling analysis-guided library design for the discovery of mutant luciferases. Biochemistry 57: 663-671.
9) Miller B.R., Demarest S.J., Lugovskoy A., Huang F., Wu X., Snyder W.B., Croner L.J., Wang N., Amatucci A., Michaelson J.S., and Glaser S.M. 2015. Stability engineering of scFvs for the development of bispecific and multivalent antibodies. Protein Eng. Des. Sel. 23:549-557.
10) Saito Y., Oikawa M., Nakazawa H., Niide T., Kameda T., Tsuda K., and Umetsu M. 2018. Machine-learning-guided mutagenesis for directed evolution of fluorescent Proteins. ACS Synth.Biol. 7: 2014-2022.
11) Schwille P., Kummer S., Heikal A.A., Moerner W.E., and Webb, W.W. 2000. Fluorescence correlation spectroscopy reveals fast optical excitation-driven intramolecular dynamics of yellow fluorescent proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97:151−156.
12) Shaner N.C., Patterson, G.H., and Davidson, M.W. 2007. Advances in fluorescent protein technology. J. Cell Sci. 120:4247− 4260.
13) Tsien R.Y. 1998. The green fluorescent protein. Annu. Rev. Biochem. 67: 509−544.
14) Ueno T., Rhone T.D., Hou Z., Mizoguchi T., and Tsuda K. 2016. COMBO: an efficient Bayesian optimization library for materials science. Mater. Discov. 4:18−21.
15) Ulmer K.M. 1983. Protein engineering. Science 219:666-671.
16) van Westen G.J., Swier R.F., Wegner J.K., Ijzerman A.P., van Vlijmen H.W., and Bender A. 2013. Benchmarking of protein descriptor sets in proteochemometric modeling (part 1): comparative study of 13 amino acid descriptor sets. J. cheminform. 5:41.
17) Wu Z., Kan S.B.J., Lewis R.D., Wittmann B.J., and Arnold F.H. 2019. Machine learning-assisted directed protein evolution with combinatorial libraries. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 116:8852-8858.
18) Zhang Y. Wu Y.Q., Xu N., Zhao Q., Yu H.L., and Xu J.H. 2019. Engineering of cyclohexanone monooxygenase for the enantioselective synthesis of (S)-omeprazole. ACS Sustainable Chem. Eng. 7:7218−7226.

MINI REVIEW

Kouzuma A

Electrical control of microbial metabolism: Towards development of electrogenetics

電気による微生物の代謝制御: 電気遺伝学の確立に向けて

東京薬科大学生命科学部
高妻　篤史

School of Life Sciences, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, 1432-1 Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan

Corresponding author: Atsushi Kouzuma, akouzuma@toyaku.ac.jp
Phone/Fax: +81-42-676-6755

Received: March 16, 2020; /Revised: March 18, 2020; March 19, 2020 / Accepted: March 19, 2020

Abstract Electrochemically active bacteria are capable of electric interactions with electrodes via extracellular electron transfer (EET) pathways and serve as essential components of bioelectrochemical systems (BES), including microbial fuel cells and electro-fermentation systems. In these bacteria, intracellular redox reactions involved in energy metabolism are electrically connected to electrodes via EET pathways, and their metabolic activity is affected by electrode potentials. A recent study has found that a model EAB, Shewanella oneidensis MR-1, senses shifts in electrode potential using an EET pathway and the Arc regulatory system, thereby regulating the expression of diverse catabolic genes. The finding of this electrode potential-dependent regulatory system suggests that gene expression in living cells can be directly controlled by using electrodes, and opens up a new methodology, termed "electrogenetics", that facilitates the application of BES. This article summarizes current knowledge on EET-related catabolic and regulatory systems in S. oneidensis MR-1 and describes the potential of electrogenetics in biotechnology.

Keywords: electrochemically active bacteria, extracellular electron transfer, bioelectrochemical system, *Shewanella*

キーワード: 電気化学活性細菌、細胞外電子伝達、微生物電気化学システム、*Shewanella*

1. はじめに

呼吸や発酵、光合成などのエネルギー代謝の根幹は酸化還元反応であり、生物の細胞内では常に物質間の電子移動が生じている。この電子の流れ（電流）を人為的に操ることができれば、生物の代謝を制御し、有用物質生産などの任意のプロセスを効率よく進行させることが可能になると思われる。しかし、多くの生物において細胞内の代謝系は絶縁体（細胞壁や細胞外膜）によって隔離されており、外界から電気的なアプローチを加えることは難しい。一方、近年の研究により、ある種の細菌は細胞外の導電性固体（電極）と電子の授受を行う能力を持つことが明らかになってきた。このような細菌は電気化学活性細菌（electrochemically active bacteria; EAB）とよばれており[22]、細胞膜（外膜および内膜）に局在する導電性シトクロム *c* から構成される細胞外電子伝達経路（extracellular electron transfer pathway; EET 経路）[41] を介して電極と相互作用することが知られている（図 1）。

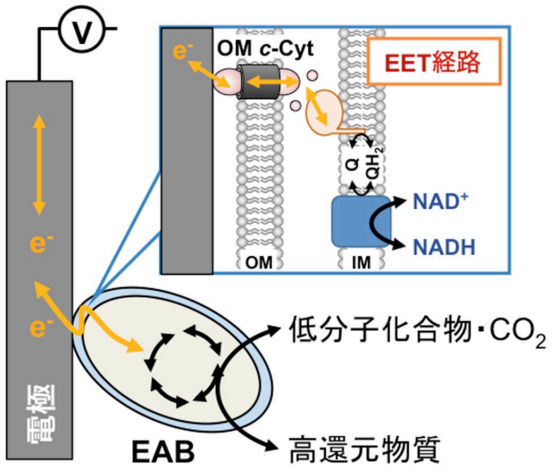


図 1　BES における電極と EAB の相互作用
OM: 外膜、IM: 内膜、OM *c*-Cyt: 外膜シトクロム *c*、Q: 酸化型キノン、QH_2: 還元型キノン。

微生物電気化学システム（bioelectrochemical systems; BES）は EAB を触媒として電気エネルギーと化学エネルギーを相互変換するシステムであり[34]、微生物燃料電池（EAB によって有機物等の化学エネルギーを電気エネルギーに変換する装置）[47]や微生物電気合成（微生物に電気エネルギーを供給し、CO_2 から有機物を合成させるプロセス）[33]、電気制御発酵（EAB の細胞内酸化還元バランスを電極によって制御し、発酵生産を促進させるプロセス）[33]などへの応用が期待されている。これらのシステムでは、電極が EAB に対して電子受容体もしくは電子供与体として働き、EAB の代謝（呼吸）と連動して電極と EAB 間に電流が発生する。つまり、BES では EAB の細胞内呼吸鎖と電極が EET 経路を介して電気的につながった状態となっており、EAB の細胞内電子キャリア（キノンや NADH など）の酸化還元反応と電極との電子授受が共役している（図 1）。そのため、電極の電位をポテンショスタット（電位制御装置）を用いて制御すれば、それに応じて EAB の細胞内電子キャリアの酸化還元比が変化し、関連する代謝反応に影響を与えることができる。キノンや NADH などの電子キャリアの酸化還元比はエネルギー代謝の進行を左右する重要な因子であり、微生物はその変化を感知して遺伝子発現と代謝経路を制御する機構を備えている[7]。このような機構と電位制御を組み合わせれば、EAB の遺伝子発現を電極によって制御する手法を構築することも可能になると考えられる。

EET 経路を持たない多くの生物は電極と直接相互作用することができないが、電子メディエーター（電極との電子授受を媒介する可溶性の酸化還元物質）を添加すれば、人為的に電極と細胞内代謝をリンクさせることが可能になる[48]。これを利用して微生物の代謝を制御しようとする試みは以前から行われており、その歴史は 1970 年代まで遡ることができる[13]。最初期の研究では、発酵細菌（*Brevibacterium flavum*）に電子メディエーター（ニュートラルレッド）を介して電極から電子を与え、グルコースから L-グルタミン酸への変換を促進させることなどが行われていた[13]。また、近年では電子メディエーターを介した電気シグナルによって遺伝子組換え大腸菌の遺伝子発現と細胞挙動（走化性など）を制御した例が報告されている[45]。しかし、電子メディエーターは一般に高い細胞毒性を示すうえに価格が高いため、実用的なプロセスに利用することは難しいと思われる。

一方、EAB であれば電子メディエーターを添加しなくとも生来の EET 経路を介して電極と直接的に電子の授受を行うことができるため、これらの細菌は電極電位の変化などの電気刺激に対して鋭敏な応答を示す。例えば、代表的な EAB である *Geobacter* 属細菌や *Shewanella* 属細菌が電極電位の変化に応じて遺伝子発現や代謝経路を変化させることが報告されている[15,21,24,29,51]。さらに、筆者らの研究グループはモデル EAB である *Shewanella oneidensis* MR-1 株の電極電位に対する生理学的応答を詳細に解析し、本株が EET 経路と Arc 制御系（内膜キノンの酸化還元比を認識する制御系）を介して電極電位を感知し、遺伝子発現を変化させることを明らかにした[11]。このメカニズムを応用すれば、電極による遺伝子発現制御法を開発できる可能性がある。そこで筆者らはこの手法を電気遺伝学（electrogenetics）と命名し[12]、その基盤確立と微生物電気化学プロセスへの応用を目指して研究を行っている。本稿では MR-1 株における EET とエネルギー代謝の分子メカニズムについて概説したのち、電気遺伝学の基礎と応用可能性について述べる。

1. *S. oneidensis* MR-1 株の EET 経路

Shewanella 属細菌はガンマプロテオバクテリア綱の通性嫌気性細菌であり、多様な呼吸能を持つことが知られている[9]。本属細菌が呼吸に利用できる電子受容体には、酸素、フマル酸、硝酸、亜硝酸、ジメチルスルホキシド、トリメチルアミン-N-オキシドなどの可溶性物質に加えて、酸化鉄（III）や二酸化マンガン（IV）などの不溶性金属化合物が含まれる[6]。*S. oneidensis* MR-1 株は最もよく研究されている *Shewanella* 属細菌であり、二酸化マンガン（IV）を還元して呼吸を行う異化的金属還元細菌として

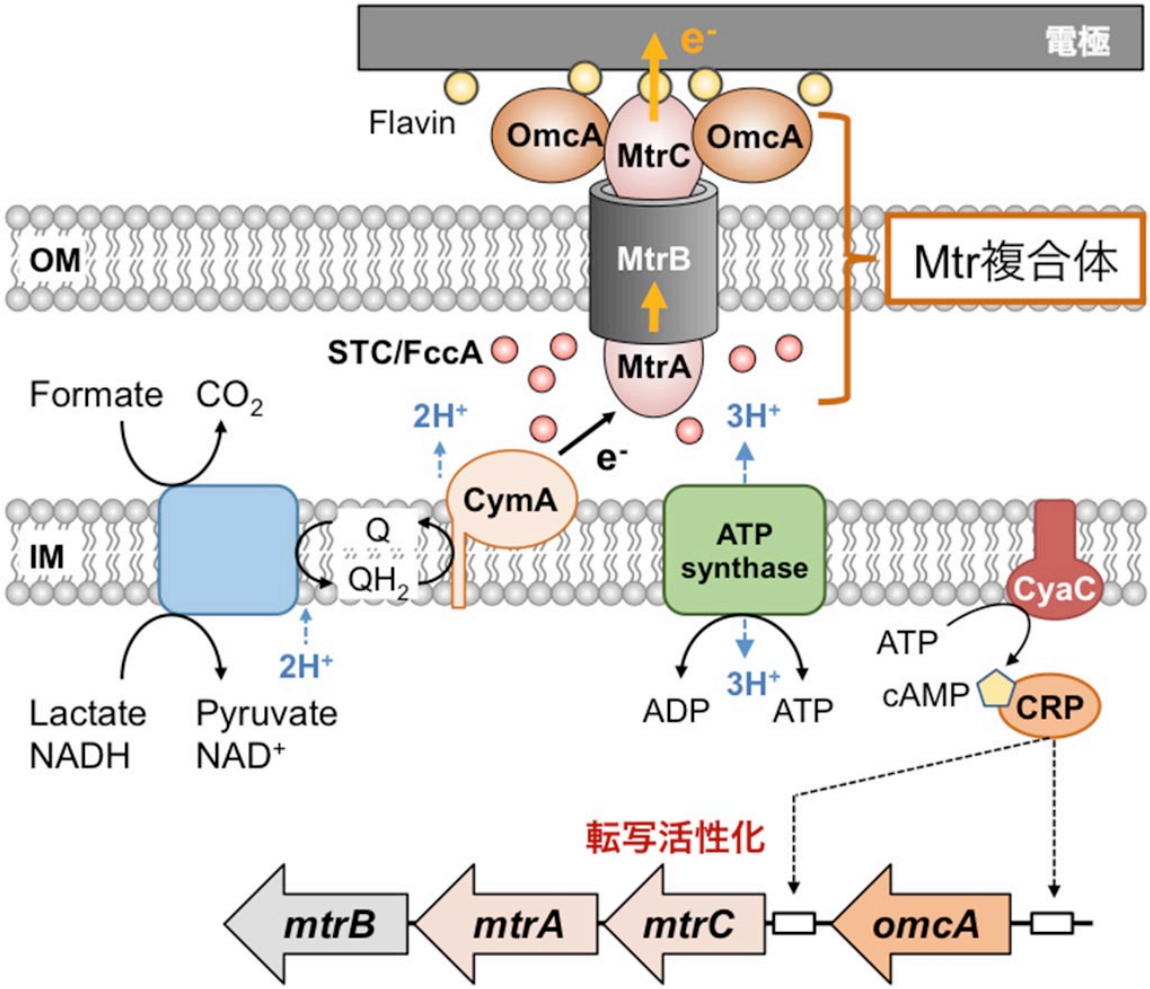


図 2　MR-1 株における EET 経路と EET 関連遺伝子群

1988 年に単離された [28]。以降、本株は異化的金属還元細菌および EAB のモデル菌株として、EET の分子メカニズムや BES における電流生成メカニズムを解明するための研究に用いられている [19]。

これまでに多くの遺伝学的・生化学的研究が行われた結果、MR-1 株では EET 経路を構成するタンパク質群が同定されている（CymA、FccA、STC、MtrA、MtrB、MtrC、および OmcA; 図 2）[41]。これらのタンパク質は主に導電性を示すシトクロム *c* であり、内膜から細胞外まで電子を伝達する役割を果たす。本経路において、電子供与体（乳酸、ギ酸、または NADH）の酸化によって生じた電子は、内膜キノンを経由し、まず CymA へと受け渡される [25]。CymA は内膜にアンカーされたペリプラズムタンパク質であり [26]、内膜キノンの酸化によって生じた電子をペリプラズムに局在する可溶性シトクロムである FccA または STC に伝達する [38,43]。これらの可溶性シトクロムはペリプラズム空間を拡散し、外膜に局在するシトクロム *c* 複合体（Mtr 複合体）まで電子を輸送する [43]。Mtr 複合体は MtrA、MtrB、MtrC、および OmcA から構成されており、ペリプラズムから外膜を通して細胞外まで電子を放出する役割を担っている [8,40]。MtrA はペリプラズム側に局在し、FccA または STC から電子を受容する [5]。MtrA に受容された電子は外膜表面に局在する MtrC と OmcA へと伝達され [8,40]、これらの外膜シトクロム *c* との直接的な接触 [49]、もしくは電子メディエーターとして自身が分泌するフラビン類（フラビンモノヌクレオチドおよびリボフラビン）を介して [23,46]、細胞外への物質へと電子が伝達される。培地中にフラビン類が含まれる場合には MR-1 株の電流生成量が大幅に増加することから [23]、本株の電流生成は主にフラビン類を介して行われると考えられている。また、フラビン類が外膜シトクロム *c* に結合し、電子伝達を介在する補因子として働くことも報告されている [30]。MtrB は β バレル構造を持つ外膜タンパク質（ポリン）であり [2]、シトクロム *c* ではないが、MtrC や MtrA と複合体を形成し、これらのタンパク質を外膜周辺

の適切な位置に配置させる役割を果たす[27]。MR-1 株の EET において、電子伝達に伴うエネルギー保存（プロトン濃度勾配の形成）は CymA までの電子伝達過程で行われると考えられている[42]。そのため、CymA 以降の電子伝達経路は、細胞内への電子の蓄積を防ぐための電子排出経路として機能しているといえる。

MR-1 株のゲノムにおいて、主な EET 関連遺伝子（*omcA*、*mtrC*、*mtrA*、および *mtrB*）は同一方向に近接して並んでいる。この遺伝子群は *omcA* と *mtrC* の上流にあるプロモーター（P_{omcA} および P_{mtrC}）から転写され、これらのプロモーターは cyclic AMP (cAMP) receptor protein (CRP) によって制御される（図 2）[17]。CRP は cAMP をインデューサーとする転写活性化因子であり、細胞内の cAMP 濃度が上昇すると CRP がプロモーター上流の標的配列に結合し、下流の遺伝子の転写を活性化する[3]。CRP と cAMP による制御系は大腸菌においてグルコース代謝のカタボライト抑制に関連してよく研究されており、大腸菌ではグルコースの存在下で cAMP 合成酵素（アデニル酸シクラーゼ）の活性が抑制されることが知られている[36]。しかし、MR-1 株を含む *Shewanell*a 属細菌における細胞内 cAMP 濃度の調節メカニズムは未解明である。MR-1 株のゲノムには 3 つのアデニル酸シクラーゼ（CyaA、CyaB、CyaC）がコードされており、これらの中で特に内膜結合型のクラス III アデニル酸シクラーゼである CyaC が主要な cAMP 合成酵素として働く[4]。また、MR-1 株において *cyaC* を過剰発現させると、BES における電流が顕著に増加することが報告されている[18]。したがって、MR-1 株における EET 関連遺伝子の発現と電流生成は CyaC の働きに依存しており、本株の電気化学活性の調節にはその活性制御が重要であるといえる。CyaC は内膜に局在することから、何らかの環境シグナルに応じてその活性が制御されている可能性が考えられる。しかし、CyaC には既知のシグナル認識ドメインが存在せず、現時点でその制御メカニズムを予想することは難しい。

MR-1 株は異化的金属還元細菌であり、自然環境中では乳酸などの基質の酸化によって生じた電子を二酸化マンガン（IV）などの電子受容体に伝達することで呼吸を行い、増殖に必要なエネルギーを得ている[28]。しかし、本株の EET 経路における電子移動は双方向的であり、BES において電極電位を MtrC などのシトクロム c の酸化還元電位よりも低く設定した場合には、電極から細胞内への電子の流入が生じる[36]。この際、内膜キノンに流入した電子が呼吸鎖を経由して酸素に伝達されると、プロトンの濃度勾配が生じて ATP が合成される[37]。つまり、MR-1 株は電極を電子受容体としてだけではなく、電子供与体としても利用して呼吸を行うことができる。したがって、本株は微生物燃料電池における発電菌として以外にも、微生物電気合成や電気制御発酵において有用物質を生産するためのホスト菌株としても利用できると考えられる。

2. *S. oneidensis* MR-1 株の炭素異化代謝経路

BES における電流生成は EAB のエネルギー代謝に基づくものであるため、その代謝メカニズムの理解は BES の効率化を図るうえで重要である。MR-1 株は炭素源・エネルギー源として乳酸やピルビン酸などの低分子有機酸を好んで利用し、これらの物質の酸化と共役して電極や他の電子受容体を還元する。一方、糖の代謝能は限られており、*N*-アセチルグルコサミン（NAG）は利用できるが、それ以外のほぼ全ての糖（グルコースなど）を資化することができない[35]。MR-1 株は有機物を豊富に含む湖底堆積物から単離されており[28]、このような環境には発酵細菌によって生成された低分子有機酸や、キチンの分解によって生じた NAG が多量に存在すると考えられる。そのため、本株はこれらの基質の資化能を発達させてきたと推測される。

MR-1 株では、ゲノム配列[10]および生化学的解析に基づいて、図 3 に示した炭素異化代謝経路が提唱されている。本株はグルコースの取り込みとリン酸化に必要な酵素を持たないが、NAG の代謝経路は保持しており[50]、この経路によって NAG はフルクトース-6-リン酸まで代謝されたのち、解糖系（エントナードウドロフ経路）によってピルビン酸へと変換される。MR-1 株は NAG 以外にも乳酸（D-乳酸および L-乳酸）を好んで利用し、D-乳酸と L-乳酸はそれぞれの光学異性体に特異的な乳酸脱水素酵素（D-lactate dehydrogenase; Dld と L-lactate dehydrogenase; LldEFG）によってピルビン酸まで酸化される[32]。これらの酵素は内膜キノンの還元と共役して乳酸を酸化すると考えられている[32]。

上記の経路によって生じたピルビン酸は、ピルビン酸脱水素酵素（pyruvate dehydrogenase; PDH）もしくはピルビン酸ギ酸リアーゼ（pyruvate-formate lyase; PFL）によって代謝される[31]。PDH は主に好気条件で働き、ピルビン酸を NAD^+依存的に酸化して、アセチル CoA と CO_2、NADH を生じる。NADH は NADH 脱水素酵素（NDH）によって酸化され、これにより内膜キノンが還元される。一方、PFL は主に嫌気条件で働き、ピ

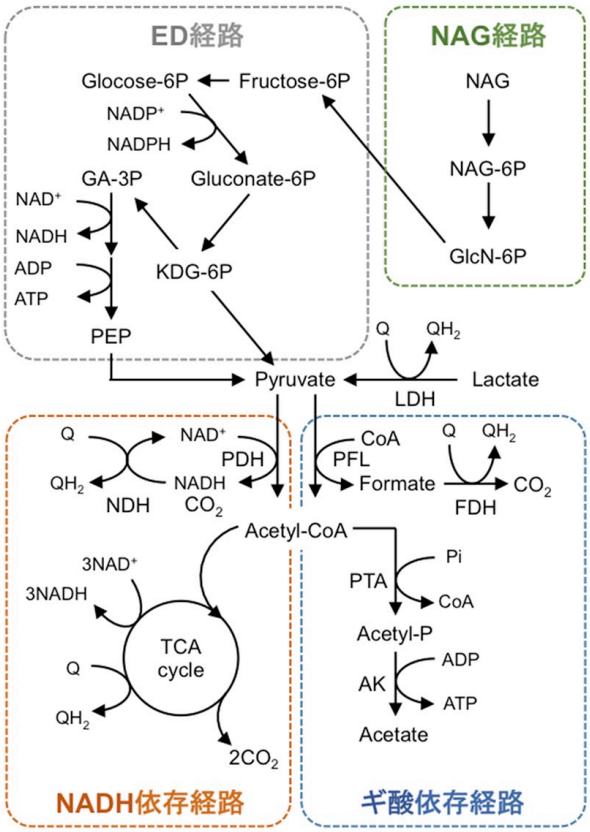


図 3　MR-1 株における主要炭素異化代謝経路
ED 経路: エントナードウドロフ経路、NAG-6P: *N*-アセチルグルコサミン-6-リン酸、GlcN-6P: グルコサミン-6-リン酸、KDG-6P: 2-ケト-3-デオキシ-6-ホスホグルコン酸、GA-3P: グリセルアルデヒド-3-リン酸、LDH: 乳酸脱水素酵素、PTA: ホスホトランスアセチラーゼ、AK: 酢酸キナーゼ。

ルビン酸をアセチル-CoA とギ酸に分解する。ギ酸はギ酸脱水素酵素（formate dehydrogenase; FDH）によって内膜キノン依存的に CO_2 に酸化される [16]。

アセチル CoA の代謝経路も環境条件によって異なる。MR-1 株は好気条件では TCA サイクルを活性化し、アセチル CoA を CO_2 まで完全に酸化する [44]。この過程で放出された電子は主に NADH を介して呼吸鎖に流入し、酸素還元に使われる。一方、嫌気条件では TCA サイクルの活性が抑制され [39]、アセチル CoA は主に酢酸合成に使われる [44]。この過程では、基質レベルのリン酸化によって ATP が合成される。嫌気条件（フマル酸呼吸条件）では、MR-1 株はほぼこの酢酸合成によって生じる ATP に依存して増殖し、呼吸鎖を介した酸化的リン酸化は増殖にほとんど寄与しないことが報告されている [14]。以上の代謝経路をまとめると、MR-1 株は環境条件に応じて内膜キノンへの電子キャリアを使い分けており、基本的に好気条件では NADH を経由する経路（NADH 依存経路）、嫌気条件ではギ酸を経由する経路（ギ酸依存経路）を利用しているといえる（図 3）。

3. *S. oneidensis* MR-1 株の電極電位認識・応答機構

BES では、電極電位を制御することによって EAB と電極間に生じる電流の量と方向を調節し、これにより EAB の触媒活性を変化させることができる。一方、EAB は電極への電子伝達（EET）によって呼吸を行っているため、電極電位の変化は EAB が増殖に利用できるエネルギー量に影響を与えるはずである。しかし、電極電位に応じて EAB の遺伝子発現や代謝系の一部が変化することは報告されていたものの [15,21,24,29,51]、EAB のエネルギー保存経路が電位によって変化するかどうかは不明であった。そこで筆者らの研究グループは、電極電位が MR-1 株のエネルギー代謝に与える影響を詳細に解析した [11]。その結果、本株は低電位（0 V vs. 標準水素電極）の電極存在下ではギ酸依存経路によってピルビン酸を代謝するが、高電位（+0.5 V）の電極存在下では NADH 依存経路を活性化し、一部のピルビン酸を PDH と NADH 脱水素酵素（NDH）を用いて代謝するようになることが明らかになった（図 4）。NADH 依存経路によってピルビン酸が代謝されると、NDH（Nuo）のプロトンポンプ活性が働き、ギ酸依存経路よりも多くのプロトン駆動力が生まれる（図 4）。したがって、MR-1 株は高電位条件では低電位条件よりも多くのエネルギーを保存し、効率よく増殖できるようになると考えられる。

上記の結果は MR-1 株が細胞外に存在する電極の電位変化に応じて細胞内の代謝経路を変化させることを示しており、どのようなメカニズムによって電極電位が感知されるのかに興味が持たれた。筆者らは MR-1 株の EET が内膜キノンの酸化還元を伴うことから、本株はキノンの酸化還元状態の変化を感知することで電極電位に応答しているのではないかと予想した。大腸菌では、内膜キノンの酸化還元状態を感知する機構として、Arc 二成分制御系が知られている [1]。MR-1 株にもそのホモログ（ArcS、HptA、ArcA から構成される三成分制御系）が存在するため [20]、これらのタンパク質が電位応答に関与している可能性が考えられた。そこでセンサーキナーゼである ArcS の欠損株（Δ*arcS* 株）を作製し、電極電位に応じたトランスクリプトーム変化を野生株と比較した [11]。その結果、*nuo* 遺伝子を含む野生株で電位応答を示した遺伝子の多くがΔ*arcS* では電位応答性を示さなかった。また、レスポンスレギュレーターである ArcA と *nuo* 遺伝子の上流領域との相互作用を解析した結果、ArcA が *nuo* 遺伝子の上流に結合することが示さ

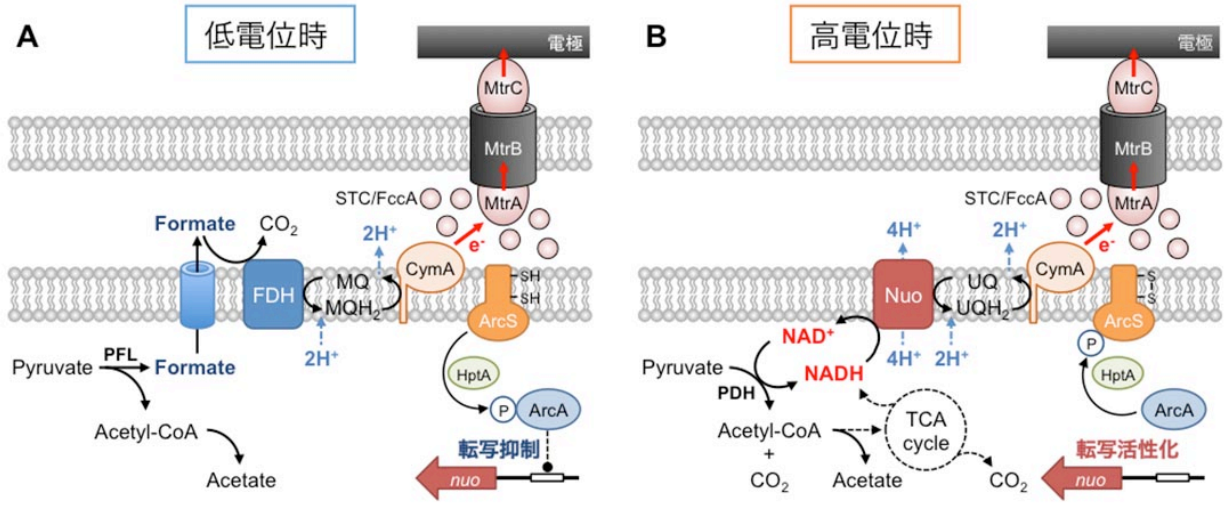


図 4　MR-1 株におけるエネルギー保存経路の電位依存性（Hirose et al., 2018 より改変）
（A）低電位時に利用されるギ酸依存経路。（B）高電位時に活性化する NADH 依存経路。MQ: 酸化型メナキノン、MQH_2: 還元型メナキノン、UQ: 酸化型ユビキノン、UQH_2: 還元型ユビキノン。

れた。これらの結果から、MR-1 株において Arc 制御系が主要な電極電位感知システムとして働き、*nuo* を含む遺伝子の発現を電位に応じて制御していることが明らかになった（図 4）。以上の結果は、MR-1 株が細胞外の電位を認識する能力を持ち、これにより酸化還元環境の変化に柔軟に適応していることを示している。電位認識は EET 経路と電気的につながった Arc 制御系によって行われることから、*Shewanella* の EET 経路は単に電子排出経路としてだけでなく，外部環境を認識するためのセンサーとしての役割を果たしているともいえる。

4. 電気遺伝学の原理と応用

上述の MR-1 株の電極電位認識機構を応用すれば、電極を用いて EAB の遺伝子発現と代謝活性を制御することが可能になると考えられる。また、この制御システムは Arc 制御系と EET 経路を導入しさえすれば、EAB 以外の生物にも適用できると思われる。筆者らはこの電極による遺伝子発現・代謝制御法を“電気遺伝学（electrogenetics）”と命名し [12]、その基盤確立に向けた研究を行っている。電気遺伝学では、電極の電位変化が遺伝子の発現を制御するシグナルとなる。いわば、光遺伝学（optogenetics）における光シグナルのかわりに、電気シグナルを用いて遺伝子発現を制御しようとするものである。この手法では、電極電位認識機構（EET 経路と Arc 制御系）を持つ、あるいはそれを人為的に導入した細胞を電位制御装置（ポテンショスタット）に接続した電極とともに培養する。この時、制御対象の遺伝子を Arc 依存性プロモーターの下流に配置しておけば、電極電位によってその遺伝子の発現を制御することができるようになる。

この手法を電気制御発酵に適用することにより、物質生産効率を大きく高めることができると考えられる。電気制御発酵（electro-fermentation）とは発酵代謝における酸化還元バランスを電極によって調節し、基質との電子バランスが釣り合わない発酵産物の生成を促すというものであり、これにより通常の発酵法では難しい高還元物質の生産を効率化することができると期待されている [33]。この際、目的物質の生産に関与する酸化還元酵素の遺伝子発現を電気遺伝学によって制御すれば、電気制御によって遺伝子発現と物質変換反応を協調的に制御することが可能となる（図 5）。筆者らはこのようなシステムの実現に向け、MR-1 株をホスト菌株とした電気制御発酵プロセスの構築を進めている。

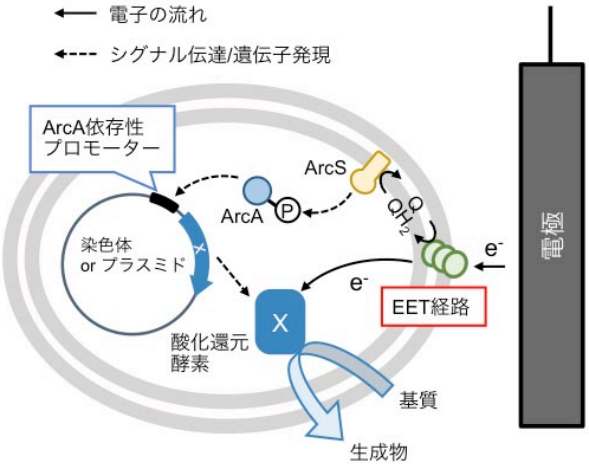


図 5　電気遺伝学を利用した電気制御発酵プロセスの概念図（Hirose et al., 2019 より改変）。

5. おわりに

BES は持続可能な電力生産や物質生産に応用できる可能性があり、新たなバイオテクノロジーとして注目を集めている。BES におけるエネルギー変換は EAB の代謝に基づくものであるため、その効率化には EAB の代謝活性を適切に制御し、できるだけ高い状態で保つことが重要となる。BES と電気遺伝学を組み合わせることで、電極を EAB に対する電子受容体・電子供与体としてだけでなく、遺伝子発現の制御装置としても利用することができる。そのため、電気遺伝学は EAB の代謝活性を制御しながら効率的に微生物電気化学プロセスを進行させるための有用なツールとなるだろう。電気遺伝学に関する研究は端緒についたばかりだが、本手法には EAB の利用を大きく促進する可能性があり、今後の発展が期待される。

謝辞

本研究は科研費（18K05399）の助成を受けて行われた。

引用文献

1) Bekker, M., Alexeeva, S., Laan, W., Sawers, G., Teixeira de Mattos, J., and Hellingwerf, K. 2010. The ArcBA two-component system of *Escherichia coli* is regulated by the redox state of both the ubiquinone and the menaquinone pool. J. Bacteriol. 192:746–754.
2) Beliaev, A. S. and Saffarini, D. A. 1998. *Shewanella putrefaciens mtrB* encodes an outer membrane protein required for Fe(III) and Mn(IV) reduction. J. Bacteriol. 180:6292–6297.
3) Botsford, J. L. and Harman, J. G. 1992. Cyclic AMP in prokaryotes. Microbiol. Rev. 56:100–122.
4) Charania, M. A., Brockman, K. L., Zhang, Y., Banerjee, A., Pinchuk, G. E., and Fredrickson J. K., et al. 2009. Involvement of a membrane-bound class III adenylate cyclase in regulation of anaerobic respiration in *Shewanella oneidensis* MR-1. J. Bacteriol. 191:4298–4306.
5) Fonseca, B., Paquete, C., Neto, S., Pacheco, I., Soares, C., and Louro, R. 2012. Mind the gap: cytochrome interactions reveal electron pathways across the periplasm of *Shewanella oneidensis* MR-1. Biochem. J. 108:101–108.
6) Fredrickson, J. K., Romine, M. F., Beliaev, A. S., Auchtung, J. M., Driscoll, M. E., Gardner, T. S., et al. 2008. Towards environmental systems biology of *Shewanella*. Nat. Rev. Microbiol. 6:592–603.
7) Green, J. and Paget, M. S. 2004. Bacterial redox sensors. Nat. Rev. Microbiol. 2:954–966.
8) Hartshorne, R. S., Reardon, C. L., Ross, D., Nuester, J., Clarke, T. A., and Gates, A. J., et al. 2009. Characterization of an electron conduit between bacteria and the extracellular environment. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 106:22169–22174.
9) Hau, H. H., Gralnick, J. A. 2007. Ecology and biotechnology of the genus *Shewanella*. Annu. Rev. Microbiol. 61:237–258.
10) Heidelberg, J. F., Paulsen, I. T., Nelson, K. E., Gaidos, E. J, Nelson, W. C., and Read, T. D., et al. 2002. Genome sequence of the dissimilatory metal ion-reducing bacterium *Shewanella oneidensis*. Nat. Biotechnol. 20:1118–1123.
11) Hirose, A., Kasai, T., Aoki, M., Umemura, T., Watanabe, K., and Kouzuma, A. 2018. Electrochemically active bacteria sense electrode potentials for regulating catabolic pathways. Nat. Commun. 9:1083.
12) Hirose, A., Kouzuma, A., and Watanabe, K. 2019. Towards development of electrogenetics using electrochemically active bacteria. Biotechnol. Adv. 37:107351.
13) Hongo, M. and Iwahara, M. 1979. Application of electro-energizing method to L-glutamic acid fermentation. Agric. Biol. Chem. 43:2075–2081.
14) Hunt,. K. A., Flynn, J. M., Naranjo, B., Shikhare, I. D., and Gralnick, J. A. 2010. Substrate-level phosphorylation is the primary source of energy conservation during anaerobic respiration of *Shewanella oneidensis* strain MR-1. J. Bacteriol. 192:3345–3351.
15) Ishii, S., Suzuki, S., Norden-Krichmar, T. M., Tenney, A., Chain, P. S. G., and Scholz, M. B.,

et al. 2013. A novel metatranscriptomic approach to identify gene expression dynamics during extracellular electron transfer. Nat. Commun. 4:1601.

16) Kane, A. L., Brutinel, E. D., Joo, H., Maysonet, R., VanDrisse, C. M., and Kotloski, N. J, et al. 2016. Formate metabolism in *Shewanella oneidensis* generates proton motive force and prevents growth without an electron acceptor. J Bacteriol. 198:1337–1346.

17) Kasai, T., Kouzuma, A., Nojiri, H., and Watanabe K. 2015. Transcriptional mechanisms for differential expression of outer membrane cytochrome genes *omcA* and *mtrC* in *Shewanella oneidensis* MR-1. BMC Microbiol. 15:68.

18) Kasai, T., Tomioka, Y., Kouzuma, A., and Watanabe, K.. 2019. Overexpression of the adenylate cyclase gene *cyaC* facilitates current generation by *Shewanella oneidensis* in bioelectrochemical systems. Bioelectrochemistry. 129:100–105.

19) Kouzuma, A., Kasai, T., Hirose, A., and Watanabe K. 2015. Catabolic and regulatory systems in *Shewanella oneidensis* MR-1 involved in electricity generation in microbial fuel cells. Front. Microbiol. 6:609.

20) Lassak, J., Henche, A. L. , Binnenkade, L., and Thormann, K. M. 2010. ArcS, the cognate sensor kinase in an atypical Arc system of *Shewanella oneidensis* MR-1. Appl. Environ. Microbiol. 76:3263–3274.

21) Levar, C. E., Chan, C. H., Mehta-Kolte, M. G, and Bond, D. R. 2014. An inner membrane cytochrome required only for reduction of high redox potential extracellular electron acceptors. MBio. 5:e02034.

22) Logan, B. E., Rossi, R., Ragab, A., and Saikaly, P. E. 2019. Electroactive microorganisms in bioelectrochemical systems. Nat. Rev. Microbiol. 17:307–319.

23) Marsili, E., Baron, D. B., Shikhare, I. D., Coursolle, D., Gralnick, J. A., and Bond, D. R. 2008. *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 105:3968–3973.

24) Matsuda, S., Liu, H., Kouzuma, A., Watanabe, K., Hashimoto, K., and Nakanishi, S. 2013. Electrochemical gating of tricarboxylic acid cycle in electricity-producing bacterial cells of *Shewanella*. PLoS One. 8:e72901.

25) McMillan, D. G. G., Marritt, S. J., Butt, J. N., Jeuken, L. J. C. 2012. Menaquinone-7 is specific cofactor in tetraheme quinol dehydrogenase CymA. J. Biol. Chem. 287:14215–14225.

26) Myers, C. R. and Myers, J. M. 1997. Cloning and sequence of *cymA*, a gene encoding a tetraheme cytochrome *c* required for reduction of iron(III), fumarate, and nitrate by *Shewanella putrefaciens* MR-1. J. Bacteriol. 179:1143–1152.

27) Myers, C. R. and Myers, J. M. 2002. MtrB is required for proper incorporation of the cytochromes OmcA and OmcB into the outer membrane of *Shewanella putrefaciens* MR-1. Appl. Environ. Microbiol. 68:5585–5594.

28) Myers, C. R. and Nealson, K. H. 1988. Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor. Science. 240:1319–1321.

29) Nakagawa, G., Kouzuma, A., Hirose, A., Kasai, T., Yoshida, G., and Watanabe, K. 2015. Metabolic characteristics of a glucose-utilizing *Shewanella oneidensis* strain grown under electrode-respiring conditions. PLoS One. 10:e0138813.

30) Okamoto, A., Hashimoto, K., Nealson, K., and Nakamura, R. 2013. Rate enhancement of bacterial extracellular electron transport involves bound flavin semiquinones. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 110:7856–7861.

31) Pinchuk, G. E., Geydebrekht, O. V., Hill, E. A., Reed, J. L., Konopka, A. E., and Beliaev, A. S., et al. 2011. Pyruvate and lactate metabolism by *Shewanella oneidensis* MR-1 under fermentation, oxygen limitation, and fumarate respiration conditions. Appl. Environ. Microbiol. 77:8234–8240.

32) Pinchuk, G. E., Rodionov, D. A., Yang, C., Li, X., Osterman, A. L, and Dervyn, E., et al. 2009. Genomic reconstruction of *Shewanella oneidensis* MR-1 metabolism reveals a previously uncharacterized machinery for lactate utilization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 106:2874–2879.
33) Rabaey, K. and Rozendal, R. A. 2010. Microbial electrosynthesis - revisiting the electrical route for microbial production. Nat Rev Microbiol. 8:706–716.
34) Rabaey, K., Angenent, L., Schroder, U., and Keller, J., editors. 2009. Bioelectrochemical systems. IWA publishing.
35) Rodionov, D. A., Yang, C., Li, X., Rodionova, I. A., Wang, Y., and Obraztsova, A. Y., et al. 2010. Genomic encyclopedia of sugar utilization pathways in the *Shewanella* genus. BMC Genomics. 11:494.
36) Ross, D. E., Flynn, J. M., Baron, D. B., Gralnick, J. A., and Bond, D. R. 2011. Towards electrosynthesis in *Shewanella*: energetics of reversing the *mtr* pathway for reductive metabolism. PLoS One. 6:e16649.
37) Rowe, A. R., Rajeev, P., Jain, A., Pirbadian, S., Okamoto, A., and Gralnick, J. A., et al. 2018. Tracking electron uptake from a cathode into shewanella cells: Implications for energy acquisition from solid-substrate electron donors. MBio. 9:1–19.
38) Schwalb, C., Chapman, S. K, and Reid, G. A. 2002. The membrane-bound tetrahaem *c*-type cytochrome CymA interacts directly with the soluble fumarate reductase in *Shewanella*. Biochem. Soc. Trans. 30:658–662.
39) Scott, J. H. and Nealson, K. H. 1994. A biochemical study of the intermediary carbon metabolism of *Shewanella putrefaciens*. J. Bacteriol. 176:3408–3411.
40) Shi, L., Chen, B., Wang, Z., Elias, D. A., Mayer, M. U., and Gorby, Y. A., et al. 2006. Isolation of a high-affinity functional protein complex between OmcA and MtrC: Two outer membrane decaheme *c*-type cytochromes of *Shewanella oneidensis* MR-1. J. Bacteriol. 188:4705–4714.
41) Shi, L., Dong, H., Reguera, G., Beyenal, H., Lu, A., and Liu, J., et al. 2016. Extracellular electron transfer mechanisms between microorganisms and minerals. Nat. Rev. Microbiol. 14:651–662.
42) Simon, J., van Spanning, R. J. M., and Richardson, D. J. 2008. The organisation of proton motive and non-proton motive redox loops in prokaryotic respiratory systems. Biochim. Biophys. Acta. - Bioenerg. 1777:1480–1490.
43) Sturm, G., Richter,. K, Doetsch, A., Heide, H., Louro, R. O., and Gescher, J. 2015. A dynamic periplasmic electron transfer network enables respiratory flexibility beyond a thermodynamic regulatory regime. ISME J. 9:1802–1811.
44) Tang, Y. J., Hwang, J. S., Wemmer, D. E., and Keasling, J. D. 2007. *Shewanella oneidensis* MR-1 fluxome under various oxygen conditions. Appl. Environ. Microbiol. 73:718–729.
45) Tschirhart, T., Kim, E., Mckay, R., Ueda, H., Wu, H. C., and Pottash, A.E., et al. 2017. Electronic control of gene expression and cell behaviour in *Escherichia coli* through redox signalling. Nat. Commun. 8:1–11.
46) Von Canstein, H, Ogawa, J., Shimizu, S., and Lloyd, J. R. 2008. Secretion of flavins by *Shewanella* species and their role in extracellular electron transfer. Appl. Environ. Microbiol. 74:615–623.
47) Watanabe, K. 2008. Recent developments in microbial fuel cell technologies for sustainable bioenergy. J. Biosci. Bioeng. 106:528–536.
48) Watanabe, K., Manefield, M., Lee, M., and Kouzuma, A. 2009. Electron shuttles in biotechnology. Curr. Opin. Biotechnol. 20:633–641.
49) Xiong, Y., Shi, L., Chen, B., Mayer, M. U., Lower, B. H., and Londer, Y., et al. 2006. High-affinity binding and direct electron transfer to solid metals by the *Shewanella oneidensis*

MR-1 outer membrane *c*-type cytochrome OmcA. J. Am. Chem. Soc. 128:13978–13979.

50) Yang, C., Rodionov, D. A., Li, X., Laikova, O. N., Gelfand, M. S., and Zagnitko, O. P, et al. 2006. Comparative genomics and experimental characterization of N-acetylglucosamine utilization pathway of *Shewanella oneidensis*. J.. Biol Chem. 281:29872–29885.

51) Zacharoff, L., Chan, C. H., Bond, D. R. 2015. Reduction of low potential electron acceptors requires the CbcL inner membrane cytochrome of *Geobacter sulfurreducens*. Bioelectrochemistry. 107:7–13.

極限環境生物学会
研究奨励賞受賞研究

Hidese R.

Ancestral sulfur transfer pathway: an implication for the early evolution of life.

硫黄転移系から紐解く初期生命の進化

神戸大学大学院 科学技術イノベーション研究科
秀瀬涼太

Graduate School of Science, Innovation and Technology, Kobe University, Rokkodai 1-1, Nada, Kobe 657-8501, Japan.

Corresponding Author: Ryota Hidese, hidese@people.kobe-u.ac.jp
Phone: +81-78-803-6356

1. はじめに

硫黄は必須元素である。L-システインやL-メチオニンの含硫アミノ酸、鉄硫黄クラスター、*S*-アデノシルメチオニン、モリブドプテリン、ビオチン、コエンザイムA、チアミン、リポ酸など含硫補因子、2-チオウリジンや4-チオウリジンなどtRNAのチオヌクレオシドはあらゆる生物の生命維持に必須である[12)]。微生物は生体分子の構成成分として以外にも、酸化硫黄［硫酸イオン（SO_4^{2-}）、亜硫酸イオン（SO^{3-}）、チオ硫酸（$S_2O_3^{2-}$）］や還元硫黄［元素硫黄（S_0）、硫化物イオン（S_2^-）、多硫化物イオン（S_nS^-）など］をエネルギー産生のために電子受容体または電子供与体として用いる[6)]。多くの微生物では、硫黄同化に硫酸イオンを用いる。例えば大腸菌は、硫酸イオンを細胞内に取り込み、これを硫化物イオンに還元する。次に*O*-ホスホセリンスルフヒドリラーゼが、硫化物イオンと*O*-アセチルセリンを基質としてL-システインを生成する反応を触媒する[7,15)]。システインデスルフラーゼ（CD）は、L-システインから硫黄の脱離反応を触媒する。CDの活性中心システイン残基上に生成したCD-S-SH（パースルフィド型）の末端硫黄が、ビオチン、リポ酸、tRNAのチオウリジン、チアミン、モリブドプテリンの硫黄源となる[5,12)]。他方、CD-S-SHより末端硫黄がユビキチン様タンパクのC末端グリシン残基（グリシン-グリシンモチーフ）のカルボキシ末端に転移し、チオカルボキシレートが生成する（図1）。これを介してtRNAチオヌクレオシド（ユーカリア）、チアミン（バクテリア）、モリブドプテリン（ユーカリア、バクテリア、アーキア）が生合成される[5,6)]。

CDはバクテリアやユーカリアの含硫補因子生合成の硫黄転移に必須である。アーキアにもCDオルソログは見られるが、その分布は限定的である[4,8)]。好塩性アーキア（*Haloferax volcanii*など）や常温性メタン生成アーキア（*Methanosarcina acetivorans*など）の多くはCDオルソログをもつ一方で、好熱性アーキアではCDオルソログをもたない種が多く存在する（好熱性メタン生成アーキア*Methanocaldococcus jannashii*、好熱好酸性アーキア*Thermoplasma volcanium*、好熱好酸性アーキア*Sulfolobus acidocaldarius*など）。好熱性アーキアは、主に熱水噴出孔や硫気孔など硫黄が豊富な環境から単離されているため、生息環境中の還元硫黄とCDオルソログの分布との関連性が思われた。超好熱性アーキア*Thermococcus kodakarensis*は元素硫黄（S_0, 化学式：S_8）を還元して硫化水素を発生しながら呼吸するが、S_0が存在しない環境では、デンプンやピルビン酸を代謝し、プロトンを電子受容体として水素発生型呼吸を行う[1)]。本菌は、増殖速度が速く、遺伝子組み換えが容易なため、好熱性アーキアのモデル生物として原始的な代謝系や高温適応機構の知見が集積している[13)]。ここでは、筆者らによる*T.*

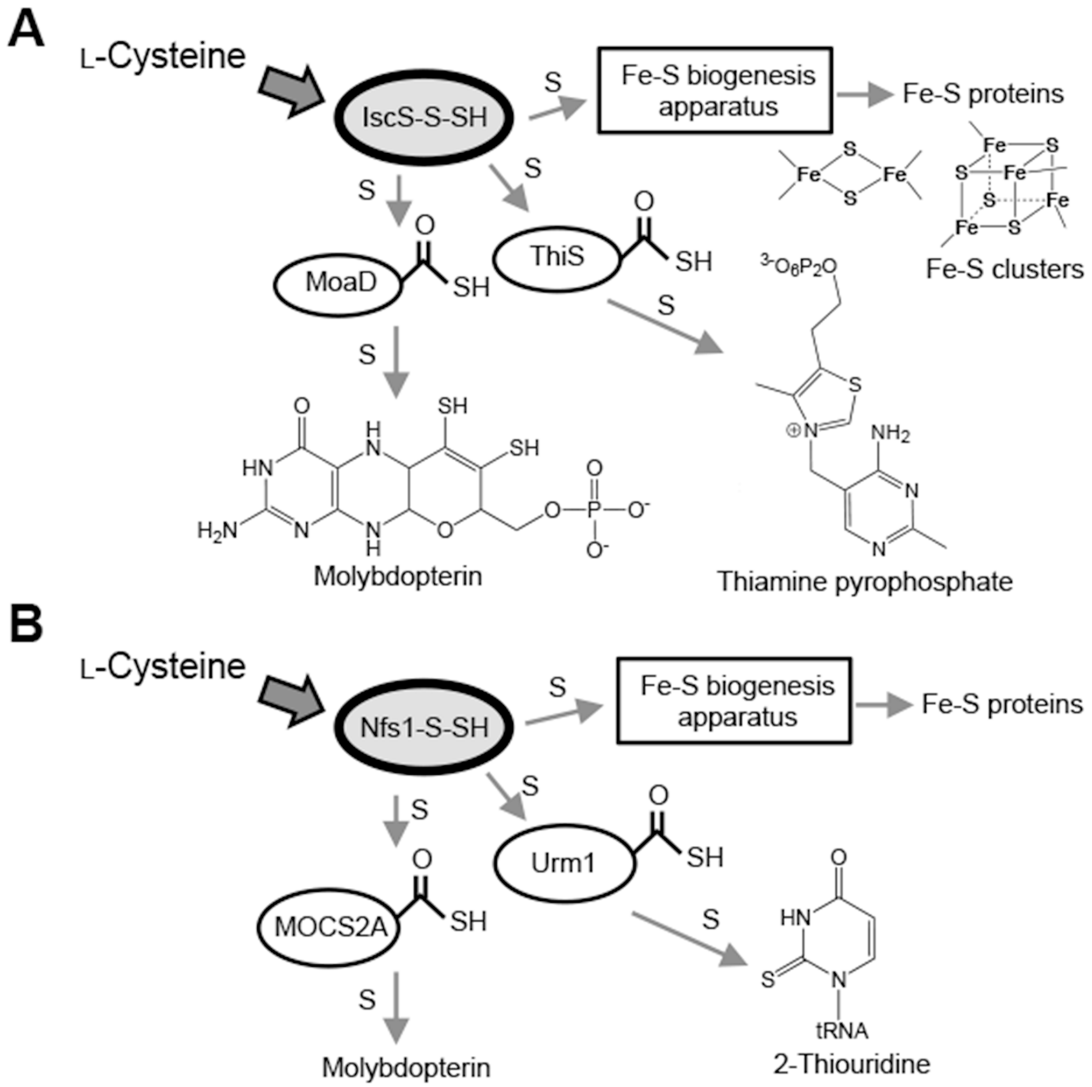


図１．システインデスルフラーゼを介した含硫化合物生合成における硫黄転移系. (A) 大腸菌の硫黄転移系. 大腸菌由来システインデスルフラーゼ IscS が L-システインの硫黄を脱離し, 活性中心システインに IscS-S-SH を形成する. IscS-S-SH の末端硫黄が鉄硫黄クラスター生合成に使われる. IscS-S-SH の末端硫黄がそれぞれユビキチン様タンパク質 MoaD や ThiS を介してモリブドプテリンやチアミンへ転移する. (B) ヒトの硫黄転移系. Nfs1, ヒト由来システインデスルフラーゼ; MOCS2A と Urm1, ユビキチン様タンパク質.

kodakarensis の硫黄転移関連酵素の解析から見えてきた、生育環境中の S_0 の有無に応じた本菌の硫黄転移系の多様性について概説する。

キーワード： 硫黄転移系、好熱性アーキア、含硫補因子、元素硫黄

2. システインデスルフラーゼ（CD）の生理的意義

T. kodakarensis のシステインデスルフラーゼ（TK1990, *Tk*-CD）を大腸菌で組み換え体として発現・精製した。*Tk*-CD は、枯草菌由来 CD（SufS）と比べて L-システインに対して高い触媒効率（*Tk*-CD: 8.1 × 10^4 $s^{-1}M^{-1}$; 枯草菌 SufS: 5.2 × 10^4 $s^{-1}M^{-1}$）を示した [4]。遺伝子機能の解析では、遺伝子破壊が極めて重要な手法となる。*T. kodakarensis* の特異的遺伝子破壊法は、Sato らにより開発されている [14]。これはオロチジン-5’-リン酸脱炭酸酵素（*pyrF*）欠損株を宿主に、*pyrF* を選択マーカーとして相同組み換えを利用した遺伝子破壊系である。本法により、*Tk*-CD 破壊株を作出した。生育特性解析の結果、*Tk*-CD 破壊株は、元素硫黄含有培地（+S_0 培地）では野生株と同等に生育した。一方、元素硫黄非含有ピルビン酸含有培地（-S_0+ピルビン酸培地）では生育不能であったが、本培地への S_0 添加量の増加に応じて *Tk*-CD 破壊株は野生株と同等の生育まで回復した。

次に、*Tk*-CD の鉄硫黄クラスター生合成への関与を調べた。-S_0+ピルビン酸培地に少量の S_0 を加えた培地で生育した野生株と *Tk*-CD 破壊株の鉄硫黄クラスター含有酵素（ピルビン酸：フェレドキシン酸化還元酵素、アルデヒド：フェレドキシン酸化還元酵素、$NADP^+$:フェレドキシン酸化還元酵素）活性を嫌気チャンバー内（O_2 < 1.0 ppm）で測定した。この結果、*Tk*-CD 破壊株で各酵素活性が顕著に減少していた。以上の結果は、*T. kodakarensis* には、環境中の S_0 依存及び CD 依存鉄硫黄クラスター生合成系が存在する事を示している。CD 依存鉄硫黄クラスター生合成能を獲得できた結果、S_0 が存在しない環境で本菌の生育が可能となったと考えられた。

3. 硫黄キャリアーとしてのユビキチン様タンパク質

T. kodakarensis の CD 依存及び S_0 依存鉄硫黄クラスター生合成能の存在は、ユビキチン様タンパク質の硫黄転移への関与について興味が持たれた。つまり、「環境中に S_0 が存在する場合でも、ユビキチン様タンパク質を介してモリブドプテリンや tRNA チオヌクレオシドなどの含硫化合物が生合成されるのか」である。大腸菌ではユビキチン様タンパク質は、チアミン、モリブドプテリンへの硫黄キャリアーとしての役割をもつ。また、酵母やヒトでは、ユビキチン様タンパク質はモリブドプテリンの他、tRNA チオヌクレオチドへの硫黄転移に関わる。ユビキチン様タンパク質はアーキアにも高度に保存されており、この中には CD をもたないアーキアも多く含ま

表 1. アーキアにおけるシステインデスルフラーゼとユビキチン様タンパク質の分布

Organism	CD ortholog	ULP ortholog
Haloferax volcanii	HVO_RS05220	SAMP1, SAMP2, SAMP3
Thermococcus kodakarensis	TK1990	TK1065, TK1093, Tk2110
Pyrococcus horikoshii	–	PH_RS02725, PH_RS04800, PH_RS05175, PH_RS07545
Thermoplasma volcanium	–	TVG_RS00615, TVG_RS02985, TVG_RS04275
Archaeoglobus fulgidus	AF_RS00930, AF_RS02865	AF_RS00100, AF_RS02805, AF_RS08170, AF_RS10595
Methanocaldococcus jannaschii	–	–
Methanococcus maripaludis	–	MMP_RS03440, MMP_RS07000
Methanothermobacter marburgensis	MTBMA_RS08670	MTBMA_RS01575
Pyrobaculum arsenaticum	–	PARS_RS04175, PARS_RS05080, PARS_RS10525, PARS_RS11990
Sulfolobus acidocaldarius	–	SACI_RS03190, SACI_RS04545, SACI_RS07880
Hyperthermus butylicus	–	HBUT_RS00680, HBUT_RS03065, HBUT_RS05700

棒線は，各オルソログ遺伝子が当該生物に保存されていないことを示す．略語:CD，システインデスルフラーゼ; ULP，ユビキチン様タンパク質.

れる（表１）。好塩性アーキア *Haloferax volcani*i において、ユビキチン様タンパク質 SAMP1 はモリブドプテリン生合成に関わること、SAMP2 は tRNA チオ化修飾に関わることがわかっている[11]。ユビキチン様タンパク質は硫黄転移の他に、タンパク質の翻訳後修飾としての役割を担う。*T. kodakarensis* にもユビキチン様タンパク質オルソログが 3 種（TK1065、TK1093、TK2118）存在する。系統解析によると、TK2118 と TK1093 はそれぞれ *H. volcanii* 由来 SAMP1 と SAMP2 と相同性が高いことがわかった。モリブドプテリン生合成や tRNA の硫黄化修飾において、これらユビキチン様タンパク質の機能を検証した。

モリブドプテリン生合成への関与 *T. kodakarensis* の糖代謝にはモリブドプテリン含有酵素であるグリセロアルデヒド-3-リン酸：フェレドキシン酸化還元酵素（GAPOR）が関与する。本酵素遺伝子破壊株は、デンプンなどを炭素源とした培養条件では生育致死となる[10]。*T. kodakarensis* に存在する 3 種のユビキチン様タンパク質遺伝子のそれぞれを破壊した株を作出した（ΔTK1065、ΔTK1093、ΔTK2118 株）。S_0 非含有デンプン含有培地でのそれぞれを 85°C（至適生育温度）で培養したところ、ΔTK1065 株やΔTK1093 株は生育した一方で、ΔTK2118 株は生育しなかった。

次に、ユビキチン様タンパク質の破壊がモリブドプテリン含有酵素活性に及ぼす影響を調べるために、-S_0+ピルビン酸培地で生育した野生株および各遺伝子破壊株より細胞抽出液を調製し、モリブドプテリン含有酵素（GAPOR; アルデヒド：フェレドキシン酸化還元酵素, AOR; ホルムアルデヒド：フェレドキシン酸化還元酵素, FOR）活性を測定した。この結果、ΔTK1065 株、ΔTK1093 株、ΔTK2118 株ともに AOR や FOR 活性が野生株と比べて低下した（GAPOR は検出感度以下）。

S_0 含有培地で生育した野生株およびユビキチン様タンパク質をもたない株（ΔTK1065, ΔTK1093, ΔTK2118: 3 重遺伝子破壊株）の 3 種のモリブドプテリン含有酵素活性（GAPOR, AOR, FOR）を測定したところ、いずれの酵素活性も野生株と 3 重遺伝子破壊株で同等であった。これは、S_0 が存在しない環境では、ユビキチン様タンパク質がモリブドプテリン生合成に関わるが、S_0 が存在する環境では、それらが必須ではないことを示している（図 2）。以上の結果より、いずれのユビキチン様タンパク質でもモリブドプテリン生合成に関わることが示唆され、TK2118 は特に GAPOR の活性化に関わると予想された。

tRNA の硫黄化修飾への関与 tRNA の化学修飾（メチル化、アセチル化、硫黄化、アミノ酸付加、糖付加など）は、ほぼすべての生物で見られる。例えば、グルタミン酸、グルタミン、リジンの tRNA の 34 位は 5-メチル-2-チオウリジンである[2]。この修飾により tRNA のアンチコドンと mRNA のコドンの対合を強め、正確なコドンの解読が可能となる。また、一部の好熱菌（好熱性バクテリア *Thermus thermophilus* や超好熱性アーキア *Pyrococcus furiosus* など）では、tRNA の T-ループの 54 位も 5-メチル-2-チオウリジン誘導体に修飾される。54 位の硫黄修飾により、T-ループと D-ループから構成される tRNA の肩領域の構造が安定化され、tRNA の熱安定性が向上する[17]。実際、*T. thermophilus* でこの硫黄修飾を不能にさせると、高温で生育致死になる[16]。

+S_0 培地でΔTK1065 株、ΔTK1093 株、ΔTK2118 株のそれぞれを 85°C、93°C（生育上限温度）で培養した。85°C では、ΔTK1093 株で野生株と比べてわずかな生育遅延が見られ、93°C では、ΔTK1093 株は生育が遅延し、最高菌体濁度が減少した。さらに-S_0+ピルビン酸培地では、85°C でΔTK1093 株とΔTK2118 株で生育が遅延し、93°C で両株とも生育致死になった。次に、各遺伝子破壊株における tRNA の硫黄化修飾率を調べるため、+S_0 培地および-S_0+ピルビン酸培地で各遺伝子破壊株（ΔTK1065 株、ΔTK1093 株、ΔTK2118 株、3 重遺伝子破壊株）の tRNA ヌクレオシドを液体クロマトグラフタンデム型質量分析計で解析した。この結果、-S_0+ピルビン酸培地で生育したΔTK1093 株および 3 重遺伝子破壊株において tRNA ヌクレオシド（tRNA の 54 位に見られる 5-メチル-2-チオウリジン修飾など）のチオ化修飾の顕著な減少が見られた。しかしながら、チオ化修飾は完全には消失しておらず、また+S_0 培地においてはこの減少が見られなかった。以上の結果から、TK1093 が tRNA チオ化修飾関連タンパク質であること、tRNA のチオ化修飾には TK1093 が関与する硫黄転移経路とこれを必要としない経路が存在することが示唆され、これらの経路は培地中の S_0 の存在に応じて使い分けがなされている可能性が考えられた（図 2）。

4. おわりに

好熱菌は、進化系統樹で根の近傍に位置するため、原始生命体の形質を強く保存していると考えられる。原始生命体は、鉄硫黄クラスター、*S*-アデノシルメチオニン、補酵素 A、モリブドプテリン、遷移金属、コリンやセレン原子を豊富にもち、主にラジカル反

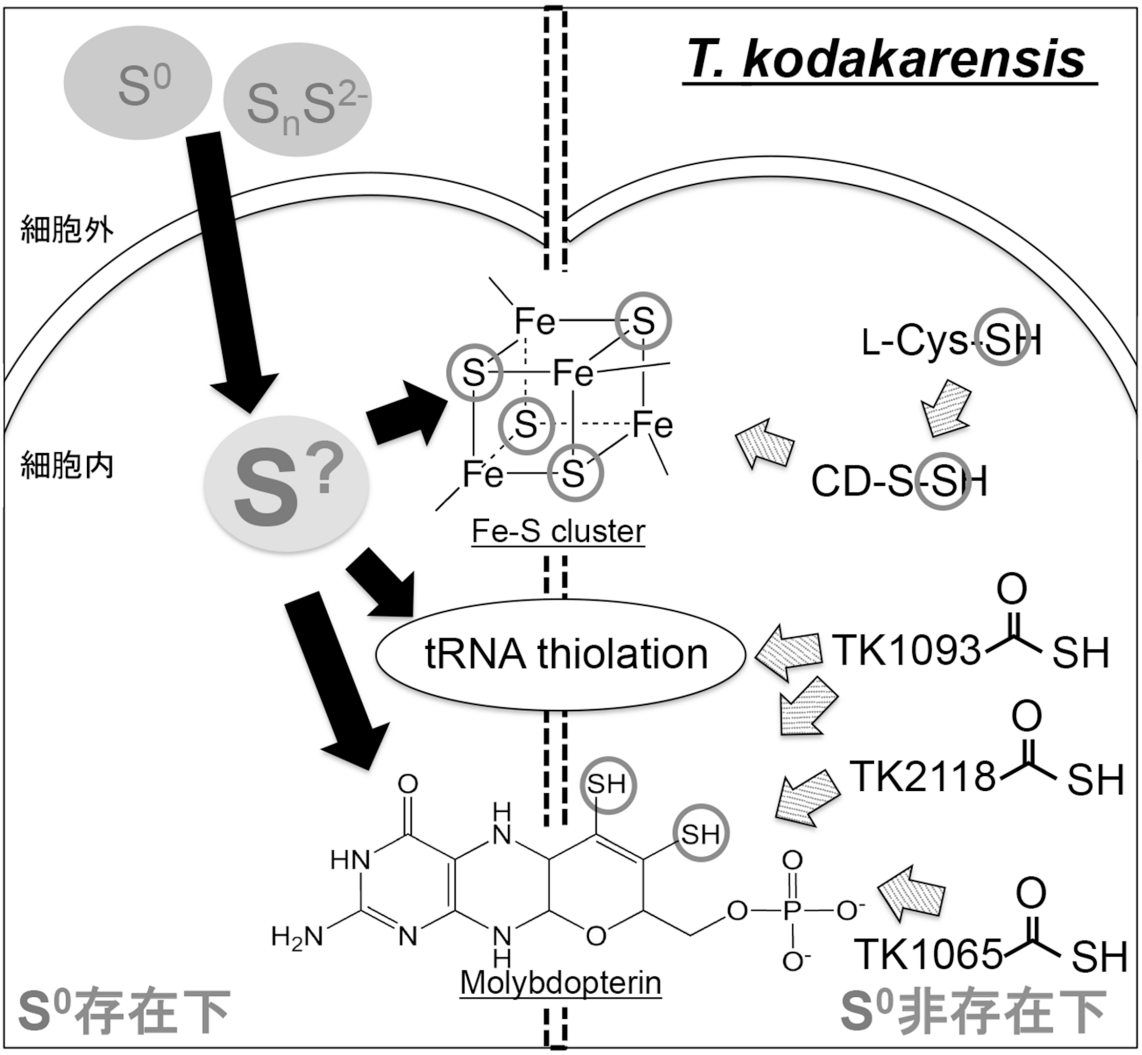


図２. *T. kodakarensis* の含硫化合物生合成の硫黄転移系. 元素硫黄（S_0）非存在下では, システインデスルフラーゼ（CD）は鉄硫黄クラスター生合成に必須である. ユビキチン様タンパク質 TK1093 は tRNA のチオ化修飾, 全てのユビキチン様タンパク質はモリブドプテリン生合成の硫黄転移を担う. S_0 存在下では, CD やユビキチン様タンパク質に非依存の系が主要と思われる.

応により生命機能を維持していたものと考えられている[18]。初期地球の嫌気環境では、二酸化硫黄、硫化水素と共に S_0 は豊富な硫黄種であった[19]。これらの存在比は、火山ガス中の水素の分圧により決定される。メタン生成アーキアは、培養液中に 5 mM 程度の硫化物イオンを生育に要求し、これを硫黄ドナーとした特殊な硫黄転移系をもつ生物として知られる。例えば、常温性メタン生成アーキア *Methanococcus maripaludis* の鉄硫黄クラスターの硫黄源は L-システインではなく、硫化物イオンである[8]。また tRNA の 8 位の 4-チオウリジン修飾では、硫黄転移酵素 MMP1354 が硫化物イオンを利用する[9]。実際、 *M. maripaludis* の細胞内の L-システインのプールサイズは 20 μM 程度であり、これは一般にバクテリアで見られる L-システインの濃度よりも 5-10 倍程度低い。超好熱性メタン生成アーキア *Methanocaldococcus jannaschii* のチアミン生合成の硫黄転移では、チアゾール合成酵素が硫化物イオンを基質にしてチアミン前駆体（ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドとグリシンの反応中間体）に硫黄を挿入する[3]。チアゾール合成酵素と相同なタンパク質は、多くの好熱性アーキアに見出されている。このように原始生命体では、還元硫黄を基質にする硫黄転移酵素が含硫化合物の生合成に寄与していたことが推察される。

T. kodakarensis の CD やユビキチン様タンパク質の解析から、鉄硫黄クラスター生合成の硫黄転移のみならず、モリブドプテリン生合成の硫黄転移や tRNA の硫黄化修飾において、S_0 に依存した系をもつことがわかってきた。個々のユビキチン様タンパ

ク質の機能重複や分担も興味深い。*T. kodakarenisis* は CD 依存的鉄硫黄クラスター生合成の場合と同じく、ユビキチン様タンパク質の獲得（もしくは既存のタンパク質の機能の多様化）とそれに伴うモリブドプテリン生合成系や tRNA の硫黄化修飾系の獲得の結果、S_0 が存在しない環境で代謝の多様性を確保したと予想される。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました藤原伸介先生（関西学院大学理工学部）に衷心より御礼を申し上げます。様々なご助言・ご助力を頂いた関西学院大学理工学部 微生物工学研究室の皆様にも感謝申し上げます。tRNA ヌクレオシドの硫黄修飾の解析では、鴫直樹先生（産業総合技術研究所）、鈴木勉先生（東京大学工学部）、大平高之先生（東京大学工学部）のご指導を賜りました。京都大学化学研究所での指導教員である江崎信芳先生（公立鳥取環境大学）、栗原達夫先生（京都大学化学研究所）、三原久明先生（立命館大学生命科学部）に深く御礼申し上げます。本研究は、JSPS 科研費（JP17H05027）及び長瀬科学技術振興財団平成 30 年度助成金の支援を受けて実施されました。

参考文献

1) Atomi, H., Fukui, T., Kanai, K., Morikawa, M., and Imanaka, T. 2004. Description of Thermococcus kodakaraensis sp. nov., a well studied hyperthermophilic archaeon previously reported as Pyrococcus sp. KOD1. Archaea. 1:263-267.

2) Björk, G.R. 1995. In tRNA: Structure, Biosynthesis, and Function (Söll, D. & RajBhandary, U. eds.), pp. 165−205, ASM press, Washington DC.

3) Eser, B.E., Zhang, X., Chanani, P.K., Begley, T.P., and Ealick, S.E. 2016. From Suicide Enzyme to Catalyst: The Iron-Dependent Sulfide Transfer in Methanococcus jannaschii Thiamin Thiazole Biosynthesis. J. Am. Chem. Soc. 138:3639-3642.

4) Hidese, R., Inoue, T., Imanaka, T., and Fujiwara, S. 2014. Cysteine desulphurase plays an important role in environmental adaptation of the hyperthermophilic archaeon Thermococcus kodakarensis. Mol. Microbiol. 93:331-345.

5) Hidese, R., Mihara, H., and Esaki, N. 2011. Bacterial cysteine desulfurases: versatile key players in biosynthetic pathways of sulfur-containing biofactors. Appl. Microbiol. Biotechnol. 91:47-61.

6) Liu, Y., Beer, L.L., and Whitman, W.B. 2012. Sulfur metabolism in archaea reveals novel processes. Environ. Microbiol. 14:2632-2644.

7) Liu, Y., Beer, L.L., and Whitman, W.B. 2012. Methanogens: a window into ancient sulfur metabolism. Trends Microbiol. 20:251-258.

8) Liu, Y., Sieprawska-Lupa, M., Whitman, W.B., and White, R.H. 2010. Cysteine is not the sulfur source for iron-sulfur cluster and methionine biosynthesis in the methanogenic archaeon Methanococcus maripaludis. J. Biol. Chem. 285:31923-31929.

9) Liu, Y., Zhu, X., Nakamura, A., Orlando, R., Söll, D., Whitman, W.B. 2012. Biosynthesis of 4-Thiouridine in tRNA in the Methanogenic Archaeon Methanococcus maripaludis. J. Biol. Chem. 287:36683-36692.

10) Matsubara, K., Yokooji, Y., Atomi, H., and Imanaka, T. 2011. Biochemical and genetic characterization of the three metabolic routes in Thermococcus kodakarensis linking glyceraldehyde 3-phosphate and 3-phosphoglycerate. Mol. Microbiol. 81: 1300-1312.

11) Miranda, H.V., Nembhard, N., Su, D., Hepowit, N., Krause, D.J., Pritz, J.R., Phillips, C., Söll, D., and Maupin-Furlow, J.A. 2011. E1- and ubiquitin-like proteins provide a direct link between protein conjugation and sulfur transfer in archaea. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 108:4417-22.

12) Mueller, E.G. 2006. Trafficking in persulfides: delivering sulfur in biosynthetic pathways. Nat. Chem. Biol. 2:185-94.

13) Rashid, N., and Aslam, M. 2019. An overview of 25 years of research on Thermococcus kodakarensis, a genetically versatile model organism for archaeal research. Folia Microbiol. (Praha). doi: 10.1007/s12223-019-00730-2.

14) Sato, T., Fukui, T., Atomi, H., and Imanaka, T. 2003. Targeted gene disruption by homologous recombination in the hyperthermophilic archaeon Thermococcus kodakaraensis KOD1. J.

Bacteriol. 185:210-220.

15) Sekowska, A., Kung, H.F., and Danchin, A. 2000. Sulfur metabolism in Escherichia coli and related bacteria: facts and fiction. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2:145-177.

16) Shigi, N., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., and Watanabe, K. 2006. Identification of two tRNA thiolation genes required for cell growth at extremely high temperatures. J. Biol. Chem. 281:14296-14306.

17) Watanabe, K., Oshima, T., Saneyoshi, S., and Nishimura, S. 1974. Replacement of ribothymidine by 5-methyl-2-thiouridine in sequence GTψC in tRNA of an extreme thermophile. FEBS Lett. 43:59-63.

18) Weiss, M.C., Sousa, F.L., Mrnjavac, N., Neukirchen, S., Roettger, M., Nelson-Sathi, S., and Martin, W.F. 2016. The physiology and habitat of the last universal common ancestor. Nat. Microbiol. 1:16116.

19) 酒井 均. 1998. 自然界の硫黄−酸化状態はどう決まるのか？ 化学と教育. 46:218-2

極限環境生物学会
研究奨励賞受賞研究

Kawamoto J.

Elucidation of the cold-adaptation mechanism of an Antarctic bacterium

南極由来の低温適応細菌の環境適応機構の解明

京都大学 化学研究所 分子微生物科学研究領域
川本　純

Institute for Chemical Research, Kyoto University, Gokasyo, Uji, Kyoto 611-0011, Japan

Corresponding Author: Jun Kawamoto
e-mail: jun_k@mbc.kuicr.kyoto-u.ac.jp
Phone: +81-774-38-4711, Fax: +81-774-38-3248

1. はじめに

地球は、極地や深海、氷河や高山といった低温の極限環境が地表の約 80% を覆う低温の惑星といえる。このような低温環境には、低温を好む生物種が存在し、特に低温菌、好冷菌と呼ばれる低温適応性の細菌群が低温環境における物質循環に寄与している。低温菌、好冷菌が生産する酵素は低温での触媒活性を有する優れた触媒であり、低温活性酵素と呼ばれている。これまでに、食品産業や繊維産業、浄水に利用可能な様々な低温活性酵素が単離され、多様な産業分野で活用されている。これらの低温活性酵素について、低温での活性発現に資する分子機構の詳細が明らかにされており、例えば、多くの低温活性酵素において、構造安定性と低温での活性保持がトレードオフの関係にあることがわかっている。つまり、低温活性酵素はタンパク質の構造を不安定化することで、低温での触媒能を獲得している。このように、低温菌・好冷菌に関する従来の研究の多くは、低温活性酵素に関するものであった。一方で、低温菌・好冷菌が如何にして低温環境に適応しているかについての理解は限定的といえる。このような背景のもと、筆者は低温菌の低温環境適応機構を分子レベルで理解することを目指した研究に取り組んできた。本稿においては、南極に生息する低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 を対象とし、本菌の低温での生育を支えるタンパク質および生体膜脂質について紹介する。

2. *Shewanella livingstonensis* Ac10 の低温誘導性タンパク質の探索

Shewanella livingstonensis Ac10 は南極海水より採取されたグラム陰性細菌であり、4°C から 25°C で良好に生育し、18°C を至適生育温度とする低温菌である。本菌に関しては 2002 年より全ゲノム情報が利用可能であったことから、ゲノム情報に基づき、本菌の低温環境適応を支える生体分子の探索・同定が可能であった。そこで、筆者は 4°C もしくは 18 °C で培養した *S. livingstonensis* Ac10 から低温で生産量が増加する低温誘導性の可溶性タンパク質および疎水性タンパク質の探索および同定に取り組んだ [6]。さらに、呼吸やシグナル伝達、エネルギー生産といった重要な生理機能を担う細胞内膜局在性のタンパク質群に着目し、密度勾配遠心法により分画した本菌の細胞内膜についてプロテオーム解析を行うことで、低温誘導性の内膜タンパク質を同定した [10]。

これら低温誘導タンパク質群より推定される本菌の低温適応機構の概要を Fig. 1 に示す。低温環境において、*S. livingstonensis* Ac10 は遺伝子の転写、翻訳に関わるタンパク質群が同定された。これらは、低温によって生じる mRNA やタンパク質の立体構造を支える RNA シャペロン（CspA）や peptidyl-proryl *cis-trans* isomerase (PPIase) 活性を有することが予想されるタンパク質群（Tig, SurA）が含まれていた。特に、低温菌において PPIase 活性を有するタンパク質の誘導生産は、低温適応性のアーキア *Methanococcoides burtonii1* [3]、シベリア永久凍土由来の *Psychrobacter cryohalolentis* [1]においても報

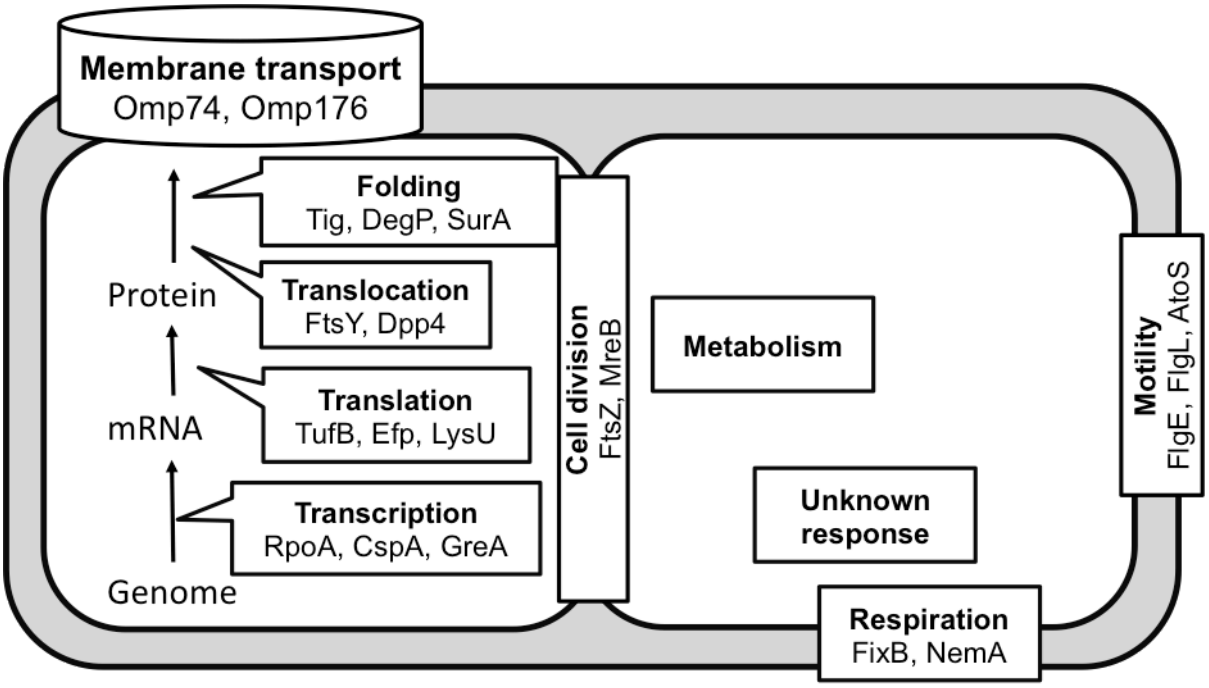


Figure 1　*Shewanella livingstonensis* Ac10 の低温誘導性タンパク質群の機能

告されている。本酵素は、タンパク質の立体構造形成の律速段階を担う異性化酵素であり、低温において PPIase を誘導生産することで、低温でのタンパク質の構造形成を円滑にしていることが示唆された。また、低温においては水の粘性が増加し、可溶性分子の拡散速度が低下することが知られており、細菌による可溶性の栄養素の取り込みや老廃物の排出能が低下することが予想されるが、*S. livingstonensis* Ac10 は細胞外膜のポーリンタンパク質（Omp74、Omp176）、低温においても積極的な物質輸送を可能にしている可能性が示された。

3. 細菌の低温環境適応機構における生体膜脂質の生理機能

生体膜は外界と細胞内を区画化し、細胞内を保護するバリア機能に加え、外界や細胞間の情報を受け取るインターフェース機能、物質輸送やエネルギー生産といった生命活動を支える多様な機能を担う組織である。細菌の環境適応機構の詳細や、低温菌を活用した新たな産業の創生においても、生体膜の機能や構造を化学的に理解することが重要であることは疑う余地はない。筆者らは、本菌の低温環境適応機構において生体膜が担う生理的役割を解明するために、本菌の生体膜を構成するリン脂質に着目した。

S. livingstonensis Ac10 は低温誘導的にエイコサペンタエン酸（EPA）を総脂肪酸の 5-10% まで生産する。EPA は 20 の炭素と 5 つの非共役二重結合で構成される長鎖多価不飽和脂肪酸であり、細菌からヒトなどの高等生物の生体膜を構成するリン脂質のアシル鎖として存在する（Fig. 2）。ヒトにおいては、動脈硬化や脳溢血といった血管系疾患の発症リスクを軽減する効果や、抗炎症性脂質メディエーターの前駆体であることから、ヒトの健康維持に重要な脂肪酸として、これらを含む健康食品やサプリメントが注目されている。細菌においては、深海や極地の海水といった低温の海洋環境から採取された低温菌の多くが、EPA やその類縁体であるドコサヘキサエン酸（DHA）を生産し、これらの脂肪酸の生合成遺伝子クラスターを有していることから、細菌の低温や高水圧への適応に、EPA や DHA を含むリン脂質の関与が示唆されている。そこで、筆者は *S. livingstonensis* Ac10 の EPA 生合成遺伝子を破壊することで、本菌における EPA の生理機能の解明に取り組んだ[7]。

細菌において、EPA はポリケチド合成酵素の類縁タンパク質群によって生合成され、他の脂肪酸とは独立した系で生産される。EPA 生合成遺伝子を破壊

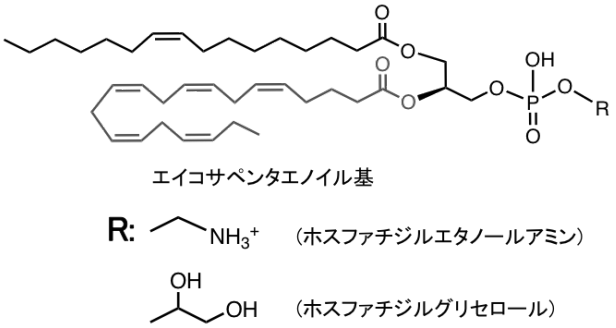


Figure 2　EPA 含有リン脂質の構造

した EPA 非生産株（ΔEPA）は、本菌の至適生育温度である 18°C においては野生株と同様に生育するのに対して、4°C において顕著に生育速度が低下することがわかった。遊離の EPA もしくは有機合成した EPA 含有リン脂質を含む培地をもちいることで、ΔEPA の生育速度の低下は抑制され、野生株と同様に生育したことから、低温での生育において EPA が重要な機能を担うことが示された。一般に、低温環境において EPA や DHA は生体膜の流動性を向上させると考えられてきた。EPA の欠損による本菌の膜流動性への影響を評価するために、疎水性蛍光分子 Pyrene の側方拡散を評価した。その結果、大腸菌と比較して本菌は顕著に流動性の高い生体膜を有しているものの、EPA の欠損は本菌の流動性には影響しないことが示された。この結果は、本菌の生体膜リン脂質を構成する脂肪酸の約 45% を占める不飽和脂肪酸パルミトレイン酸が、EPA の有無に関わらず低温での膜流動性を維持していると考えられた。一方で、本菌において EPA は膜の流動性維持以外の役割を担うことが示唆された。低温における ΔEPA を詳細に解析した結果、ΔEPA は野生株に比べて顕著に伸長した多核の細胞を形成することが明らかとなり、EPA が本菌の細胞分裂、特に DNA 分配後のステップに関与することが示された。EPA の欠損が低温適応細菌の細胞分裂に及ぼす影響は、深海由来の *Shewanella violacea* DSS12 においても確認された 8)。また、ΔEPA においては特定の膜タンパク質が減少していること、細胞内に異常な膜構造が発達していること、菌体外膜小胞を介した特定の外膜タンパク質の菌体外輸送が促進されていたことから 14)、EPA は特定の膜タンパク質の構造や安定性に関与していることが示唆された。

さらに、ΔEPA においては外膜ポーリンタンパク質である Omp74 の構造多様性が消失していることが示された。Omp74 の構造形成における EPA 含有リン脂質の生理的役割を解析するために、本タンパク質の精製タンパク質と、本菌の脂質組成を模倣した合成リン脂質をもちいたリポソームによる in vitro 再構成系を構築した結果、EPA 含有リン脂質を含むリポソームにおいて、Omp74 のフォールディングが促進されることがわかった 3)。特に、EPA 含有リン脂質は、Omp74 のリポソーム表面への吸着、疎水的環境への組込と ß-シート形成を促進したことから、EPA 含有リン脂質は低温における膜タンパク質の構造形成を促進するケミカルシャペロン様の機能を有することが示された。これは、長鎖多価不飽和脂肪酸が他の脂肪酸に比べて構造多様性に富むことで、膜タンパク質の疎水的環境への溶媒和を向上させることに起因すると考えられる[4]。本菌において、EPA は分子の挙動が抑制される低温・高圧環境下におい

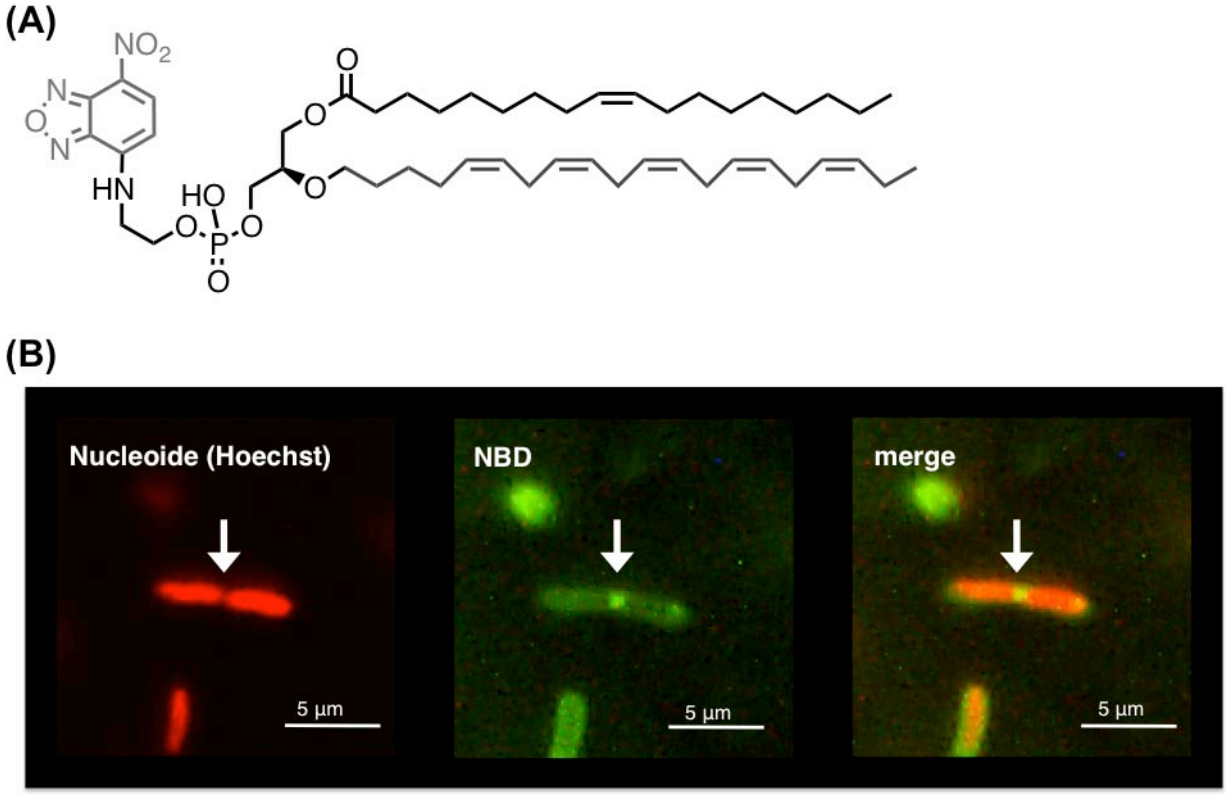


Figure 3 NBD 標識型 EPA 含有リン脂質アナログの構造 (A) と *S. livingstonensis* Ac10 における EPA 含有ドメイン (B)

てケミカルシャペロンとして、細胞分裂タンパク質の膜内での機能発現を制御していと考えられる。

4. 化学的アプローチによる EPA 含有リン脂質の可視化

EPA は生体膜に存在し、他の脂肪酸とは異なる構造により、膜厚や透過性、弾性といった物理化学的特性を変化させることで周辺の膜タンパク質の機能に影響すると考えられている。 *S. livingstonensis* Ac10 においては、EPA 含有リン脂質は、細胞分裂との関与が示唆される特定の膜タンパク質との相互作用が示唆されているが、これまでに生体膜における EPA を可視化した例はない。そこで筆者は、EPA をアシル鎖とするリン脂質の可視化を目的に、蛍光発色団をホスファチジルエタノールアミン（PE）のアミノ基に付加したリン脂質アナログの合成に取り組んだ。リン脂質のアシル鎖はエステル結合を介してグリセロール骨格の *sn*-2 位と結合しているが、本実験ではエーテル結合を介して EPA と結合することで細胞膜でのホスホリパーゼ A2 活性によるエイコサペンタエノイル基の脱離を抑制した人工プローブを合成した（AcyAlkyl-EPA, Fig. 3A）。NBD 標識型 AcyAlkyl-EPA を本菌に添加した結果、細胞分裂部位に特異的に蛍光シグナルが濃縮することが観察された（Fig. 3B）。一方で、グリセロール骨格の sn-2 位にオレイン酸を導入した対照実験では、細胞全体から均一な蛍光シグナルが検出されたことから、EPA 含有リン脂質は細胞分裂部位に特異的に濃縮した膜ドメイン構造を形成することが示された [11)]。

さらに、筆者は新たな EPA 可視化用プローブの開発に取り組んだ。先述の NBD 標識型 AcylAlkyl-EPA は極性頭部に嵩高い蛍光発色団を有し、細菌には存在しないエーテル結合を介して EPA を導入することで、細胞内のホスホリパーゼ A2 によるアシル鎖交換反応を回避する人工リン脂質プローブであり、天然型リン脂質の構造とは大きく構造が異なる。筆者は、EPA の構造を最小限に改変することで可視化に応用可能なプローブとしてオメガエチニル型 EPA （eEPA, Fig. 4）を開発した。eEPA は天然型 EPA のオメガ末端に炭素-炭素三重結合を導入していることから、レーザーラマン顕微鏡をもちいた非破壊・非染色のイメージングやアジド基を有する多様な修飾試薬との選択的な環化付加反応（クリックケミストリー）による in situ 化学修飾が可能となる。筆者は、eEPA の効率的な合成法を確立するとともに、*S. livingstonensis* Ac10 の ΔEPA をもちいて eEPA の生理機能を評価した。先述の通り、ΔEPA は野生株に比べて低温での生育速度が顕著に

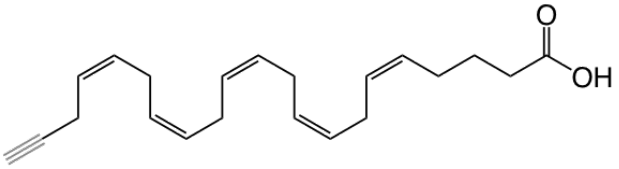


Figure 4 オメガエチニル型 EPA の構造

低下し、伸長した細胞を形成するが、eEPA を添加した培地をもちいて ΔEPA を培養したとき、EPA の欠損による生育障害は抑制された。eEPA 存在下で培養した *S. livingstonensis* Ac10 において eEPA は細胞膜リン脂質のアシル鎖として存在したことから、eEPA は天然型 EPA の生理機能を代替することが可能であることが示された [12)]。本プローブは、本菌に限らず多様な生物における EPA の可視化や、代謝物解析、相互作用するタンパク質の探索といった多様な応用が期待される汎用性の高いプローブといえる。

5. 今後の展望

低温菌は地球上で最大の生存可能域を獲得した生物種であり、このような生物が如何にして低温環境に適応しているかは生物学的に興味深いだけでなく、低温でのモノ作りのプラットフォームとしても応用可能である。筆者はこれまでに *S. livingstonensis* Ac10 を宿主とした低温異種タンパク質生産系を構築している [5, 9)]。低温菌を宿主とすることで、熱安定性の低いタンパク質や宿主細胞に対して毒性を有するタンパク質、封入体を形成しやすいタンパク質の低温での効率的な生産が可能になると期待される。実際に、本菌を宿主とすることで、熱安定性の低い低温活性酵素の生産に成功している。このように産業面への応用が期待される低温物質生産系の開発、効率化を目的としたタンパク質生産システムの開発や新たな宿主低温菌の探索を進めていきたい。

さらに、*S. livingstonensis* Ac10 の生体膜研究から、本菌が従来報告例のない EPA 含有リン脂質で構成される膜ドメインの存在が明らかとなった。次いで、他の EPA 生産菌や EPA が重要な生理機能を担う真核細胞における EPA の機能解析に取り組む。eEPA をもちいたイメージング解析を多様な生物種を対象に行うことで、低温菌に存在した新規の膜ドメインの普遍性について明らかにしたい。

6. 謝辞

本研究を遂行するに当たり多大なご指導・ご鞭撻を賜りました江崎信芳教授、栗原達夫教授、吉村徹教授、三原久明教授に厚く御礼申し上げます。また、

生体膜研究や人工プローブ合成に参画いただいた共同研究者の京都大学 佐藤智准教授、平竹潤教授、渡辺文太助教、海洋研究開発機構 加藤千明博士、青山学院大学 阿部文快教授に感謝申し上げます。最後に、本研究に様々なご助言をいただいた江崎研究室、栗原研究室の卒業生および現役生の皆様に感謝申し上げるとともに、更なるチャレンジに引き続き御支援、御協力賜りますようお願い申し上げます。

7. 参考文献

1) Bakermans C, Tollaksen SL, Giometti CS, et al 2007. Proteomic analysis of *Psychrobacter cryohalolentis* K5 during growth at subzero temperatures. Extremophiles 11:343–354. doi: 10.1007/s00792-006-0042-1

2) D'Amico S, Collins T, Marx J-C, et al 2006. *Psychrophilic microorganisms*: challenges for life. EMBO Rep 7:385–389. doi: 10.1038/sj.embor.7400662

3) Dai X-Z, Kawamoto J, Sato SB, et al 2012. Eicosapentaenoic acid facilitates the folding of an outer membrane protein of the psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10. Biochem. Biophys. Res. Commun. 425:363–367. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.07.097

4) Feller SE, Gawrisch K, MacKerell AD 2002. Polyunsaturated fatty acids in lipid bilayers: intrinsic and environmental contributions to their unique physical properties. J Am Chem Soc 124:318–326. doi: 10.1021/ja0118340

5) Kawai S, Kawamoto J, Ogawa T, Kurihara T 2019. Development of a regulatable low-temperature protein expression system using the psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10, as the host. Biosci Biotechnol Biochem 37:1–10. doi: 10.1080/09168451.2019.1638754

6) Kawamoto J, Kurihara T, Kitagawa M, et al 2007. Proteomic studies of an Antarctic cold-adapted bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10, for global identification of cold-inducible proteins. Extremophiles 11:819–826. doi: 10.1007/s00792-007-0098-6

7) Kawamoto J, Kurihara T, Yamamoto K, et al (2009) Eicosapentaenoic acid plays a beneficial role in membrane organization and cell division of a cold-adapted bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10. J. Bacteriol. 191:632–640. doi: 10.1128/JB.00881-08

8) Kawamoto J, Sato T, Nakasone K, et al 2011. Favourable effects of eicosapentaenoic acid on the late step of the cell division in a piezophilic bacterium, *Shewanella violacea* DSS12, at high-hydrostatic pressures. Environ. Microbiol. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02487.x

9) Miyake R, Kawamoto J, Wei YL, et al 2007. Construction of a low-temperature protein expression system using a cold-adapted bacterium, *Shewanella* sp. strain Ac10, as the Host. Appl. Environ. Microbiol. 73:4849–4856. doi: 10.1128/AEM.00824-07

10) Park J, Kawamoto J, Esaki N, Kurihara T 2012. Identification of cold-inducible inner membrane proteins of the psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10, by proteomic analysis. Extremophiles. doi: 10.1007/s00792-011-0422-z

11) Sato S, Kawamoto J, Sato SB, et al 2012. Occurrence of a bacterial membrane microdomain at the cell division site enriched in phospholipids with polyunsaturated hydrocarbon chains. J. Biol. Chem. 287:24113–24121. doi: 10.1074/jbc.M111.318311

12) Tokunaga T, Watanabe B, Sato S, et al 2017. Synthesis and functional assessment of a novel fatty acid probe, ω-ethynyl eicosapentaenoic acid analog, to analyze the in vivo behavior of eicosapentaenoic acid. Bioconjugate Chem. acs.bioconjchem.7b00235–41. doi: 10.1021/ acs.bioconjchem.7b00235

13) Williams TJ, Burg DW, Raftery MJ, et al 2010. Global proteomic analysis of the insoluble, soluble, and supernatant fractions of the psychrophilic archaeon *Methanococcoides burtonii*. Part I: the effect of growth temperature. J. Proteome Res. 9:640–652. doi: 10.1021/pr900509n

14) Yokoyama F, Kawamoto J, Imai T, Kurihara T 2017. Characterization of extracellular membrane vesicles of an Antarctic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10, and their enhanced production by alteration of phospholipid composition. Extremophiles 21:723–731. doi: 10.1007/s00792-017-0937-z

学会開催報告

Thermophiles 2019 (第 15 回 国際好熱菌会議)

石野良純（九州大学大学院　農学研究院）

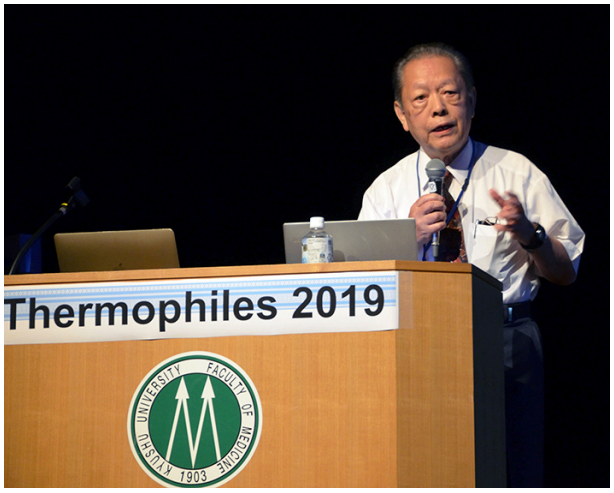
好熱性バクテリア、アーキアの研究は、極限環境で生息する生物を対象とする本学会の中でも、特に多くの会員が取り組まれている研究領域である。*Thermophiles* (国際好熱菌会議) は、これまで２年毎に世界各国で開催されてきて、　第 15 回の会議が、昨夏 9 月 2 - 6 日に福岡市の九州大学キャンパスを会場として開催された。筆者は大会長として、九大農学研究院の生物化学研究室のスタッフ、学生とともに会議の進行を務めた。*Thermophiles 2019* 開催にあたっては、極限環境生物学会に協賛いただき、助成金を活用させていただいた。まず本誌をお借りして本学会幹事、評議員、会員の皆様に感謝の意を表したい。

本会議は、第 15 回にして初の日本開催であった。筆者はジョーシア大学(USA)で開催された第 4 回大会に初めて出席して以来、今日までに好熱菌研究の領域で世界各国に多くの素晴らしい友人ができた。定年退職の前に、お世話になった多くの方々にお返しができたらとずっと願っていたことが、今回の会議を福岡で開催し、無事に終了できたことで実現でき、ほんとうに嬉しく思っている。

九州は好熱菌研究者には人気の場所である。特に別府には世界の多くの人々が興味をそそられ、筆者自身もそれまでに何度も外国からの研究者を連れて行った経験がある。また、他にも有名な温泉、火山がたくさんある。複数回訪れてくれている特に親しい方々とは、雲仙、阿蘇、霧島などへも共に旅行した。今回、火の島九州で好熱菌会議を開催し、150 名の外国人を含む 230 名の参加者を得たことは望外の喜びであった（写真１）。

開催準備にあたり、海外 38 名と国内 17 名の先生方にアドバイザーをお願いし、特に、跡見晴幸（Kyoto Univ）、布浦拓郎 (JAMSTEC)、Isaac Cann (Univ Illinois), Zvi Kelman（Univ Malyland）, Li Huang (Chinese Academy) の各先生方にご協力をいただいてプログラム編成を行った。できるだけ広い研究分野をカバーし、海外から招待したいと考えていたが、全予算が直前まで決まらず、プログラムの決定が遅れ続けて、先生方にはたいへん苦労をおかけした。また、外国人の招待につきましては、鎌形洋一博士（AIST）、望月智弘博士（ELSI, Tokyo Inst Tech）にもご協力いただいた。プログラム編成にご協力くださった先生方に厚く御礼申し上げるとともに、国内から参加くださった先生方にはいろいろとご無理を申し上げたことを、この場をお借りしてお詫びしたい。最終的に決定したプログラムには、好熱菌に関する生理学、生態学、生化学、細胞生物学、分子生物学、分子情報学が盛り込まれて、たいへん有意義な５日間であった。

本会議は、２日（月）の夕刻から始まり、オープニングセレモニーとして、これまで本会議を運営してきた現リーダーの Jennfer Littlechild 教授（Univ



Exter, UK）が、本会議の歴史について紹介した。その後のオープニングレクチャーでは、Littlechild 教授に加えて、本会議を牽引されてきた Mike Adams 教授（Univ Geogia, USA）と Patrick Forterre 教授（Inst Pasteur, France）の講演で幕開けとなった。特に、Forterre 教授は８月に満 70 歳になられ、パスツール研究所ご定年（パリ大学のほうは 65 歳で名誉教授）の記念講演として参加者から祝福された。アーキアと真核生物の進化関係を、それぞれに感染するウイルスを比較しながらの論理的な講演であった。

３日からの招待講演、一般講演で、できるだけ多くの方々に発表していただくために、苦心してプログラムを作成した。30 題のキーノート講演（外国人 25 題）と口頭発表 36 題（外国人 21 題）に加えて、ポスター発表も３日、５日の２回に分けて 95 題の発表を聴くことができた。さらに、５日（木）の昼の時間を利用して、全参加者がランチオンで、大島泰郎先生の *Thermus thermophilus* 発見 50 周年を記念した特別講演として、好熱菌研究の歴史を拝聴することができたことは、日本開催の好熱菌会議としての誇りであった（写真２）。日程の都合で一般講演では２つの会場で同時進行をせざるを得ない部分があり、すべての演題を聴くことができなかったのはたいへん残念であったが、会議を通して、広い分野の研究発表があり、好熱菌に関係する世界中の発表を集中して聴くことができ、たいへん充実した会議になったと思う。発表された研究内容について、すべてを紹介できないので、私の専門領域に近い研究発表を少し紹介したい。

Steve Bell 教授（Indiana Univ）は、アーキアで初めて染色体構造の構築に関する具体的な実験データを示した。アーキアでは、染色体がどのような 3 次元構造をとるのかほとんど解明されていなかったが、次世代シーケンサーを利用した染色体構造解析手法を *Sulfolobus* に用いることで、アーキア染色体の詳細な 3 次元構造を世界で初めて決定した。その結果、*Sulfolobus* の染色体はバクテリアよりもむしろ真核生物の染色体に近い高次構造をとること、そしてその高次構造形成に新規の SMC ファミリータンパク質「コーレシン」が関わることを示した。また、Andy Gardner 博士（NEB, USA）は、彼らが開発した RADAR-seq 法について紹介した。これは RAre DAmage and Repair sequencing 法のことで、ゲノムワイドに、一分子のレベルで DNA の損傷を検出する方法である。この方法を超好熱性アーキアにも応用し、野生株に加えて修復関連遺伝子破壊株で比較したデータなどを示した。DNA 修復研究者にとってはたいへん興味深かった。筆者の共同研究者である Hannu Myllykallio 教授 (CNRS-INSERM-Ecole Polytechnique, France)は、アーキアの主要なミスマッチ修復に関わる Endonuclease MS (EndoMS)について紹介し、アーキアとともに、EndoMS を所有する希少なバクテリアの一つである *Corynebacterium glutamicum* を用いて、細胞内でのゲノム安定性維持に EndoMS が実際に機能していることを示した。また、同じく共同研究者である Didier Flament 博士 (Ifremer, France)はアーキアにおける相同組換えの分子機構について、特に二本鎖切断の後の過程で働く Mre11-Rad50 の機能解析について紹介した。さらに、組換えに依存した複製に関する最新の知見を紹介した。

アーキアの研究領域でも CRISPR の研究者が増えているが、中でも世界の CRISPR 研究を牽引している一人である Mike Terns 教授 (Univ Geogia, USA) は、*P. furiosus* が有する CRISPR-Cas の獲得免疫機構の第１段階である、CRISPR のスペーサー領域に外来 DNA 断片が組込まれる仕組みに関する綺麗な生化学実験結果を紹介した。また、Qunxin She 教授（Univ Copenhargen, Denmark & Shandong Univ, China）は *Sulfolobus islandicus* を使って、タイプ III CRISPR-Cas の獲得免疫機構の第３段階である、エフェクターによる標的 RNA 及び DNA 切断メカニズムを詳細に研究した成果について話した。特に cyclic oligoadenylates (cOA)による Csx1 RNase の活性化機構について、解明された立体構造から議論を行った。Kira Makarova 博士（NIH, USA）は、Eugene Koonin 博士とともに CRISPR/Cas 系の系統解析をリードしているが、今回の講演ではアーキアの比較ゲノム解析をおこない、原核単細胞間の多細胞化に関わる細胞間の相互作用（Biological conflicts）に関する新しいシステムの提唱を行った。このシステムに関わる遺伝子を比較すると、生物の生理学的、形態学的、

行動的適応に顕著な痕跡がゲノム上に残り、各生物のゲノムに明確な特徴として現れてくることに気付いた。そして、その機能を解析することが重要であると提唱した。そこから、制限酵素、修飾酵素、CRISPR/Cas などの例のように、遺伝子工学のための優れた技術が生まれる可能性もある。

充実した会議は、日本を代表して、高井研 博士（JAMSTEC）と、２年後の次期会議を主催することが決まった Issac Cann 教授（Univ Illinois）の二つのクロージングレクチャーを最後として、６日夕刻に全プログラムを終了した。
会期中のポスターセッションは盛況で、ポスターの前ではいつも活発に議論する光景が見られた。ポスター賞を応募者の中から選考した。金井保先生（Kyoto Univ）に審査委員長を務めていただき、ジャンル毎に分類し、Ecology & Virus、Metabolism & Applied Microbiology、Biotechnology & RNA、DNA Repl. & Repair の４分野で、それぞれ専門とする日本人２人、外国人２人の先生方に審査員を依頼して、厳正に審査していただいた。それぞれのジャンルより Hiroyuki Sakai (RIKEN BioResource Research Center), Hae-Chang Jung (Korea Institute of Ocean Science and Technology)、Simone Antonio De Rose (Univ Exeter, UK)、Keisuke Oki (Kyushu Univ)が受賞した（写真３）。また、本会議に協賛いただいた極限環境生物学会では、極限環境生物学会員の中からポスター賞の選考を行い、大島泰郎会長から酒井博之氏（理研）に本賞が贈られた。

忙しい日程をやり繰りして、エクスカーションとバンケットも行った。エクスカーションでは、半日会議をした後、福岡市内のアサヒビール工場へ行き、アサヒビール生産現場の見学の後、ジンギスカンとビールで昼食、その後太宰府天満宮へ行った。せっかく九州へ招待したので、見ていただきたいところはいっぱいあったが、半日では場所が限られてしまったものの、暑い中を多くの参加者が賑やかにすごした。バンケットは、九大邦楽部の演奏で始まり、ポスター賞の表彰式を行い、参加者の親睦を深める場となった。

２年後にイリノイ州アルバーナ・シャンペーンで会いましょう（実際にはコロナの影響で延期となり、2022 年開催の予定）、ということで、会議は解散となった。海外からの参加者はそれぞれにいろいろとご興味があり、会議終了後に各地を訪ねられたようである。多くの方々に楽しんでいただきたかったが、体が一つしかなく、十分にお世話が行き渡らなかったのは申し訳ないが、野球の試合を見たことがないというヨーロッパからの参加者を福岡ドームに連れていって、ホークスのナイター試合を見た。地元ホークスにはまったくいいところがなく完敗の試合で、恒例である勝利の花火もなく盛り上がりに欠けたが、初めて見るプロ野球を楽しんでもらえた。

９月は例年台風が多く、もし会議と台風が重なったらという心配が付きまとったが、何とか会期中は免れ、終了直後に接近していた台風で、予定変更の参加者もおられたが、何とか皆さん帰路につかれたようで、会議を無事終了できて肩の荷が下りた。

筆者が最初に *Thermophiles* に参加した 38 歳の頃、好熱菌研究を始めて数年後で、その魅力に取り付かれていた。それから 24 年、その興味は変わらない。常温生物と同じ DNA に遺伝情報が搭載されて、どのようにその生命現象は維持されているのか、どのようにそのゲノム安定性は維持されているのか、残された時間はもう長くはないが、環境が許す限り、好熱菌の研究を続けたいと思っている。各国を取り巻く研究環境は厳しく、好熱菌の基礎研究を続けることが今後どれだけ可能なのか楽観的なものではないが、今回の *Thermophiles* には、各国から多くの若い研究者、学生も参加してくれた。彼らが今後も興味を持って好熱菌研究を続け、次の時代を担ってくれることを期待したいし、各国でその研究環境が与えられることを切に願う。

論文執筆要領

極限環境生物学会誌論文執筆要領

１．一般的事項

（１） テキストファイル形式または Microsoft Word 形式で保存できるワードプロセッサ等を用いて原稿を作成すること。

（２） タイトルページには、1)論文題名、2)著者名、3)著者所属機関名、4)ランニングタイトル、5)連絡対応著者名およびその連絡先住所・電話番号・FAX 番号・e-mail アドレス、6)キーワード（５語以内）を明示すること。日本語で作成した論文には、これらの英語訳を併記すること。

（３） 論文印刷には A4 版用紙の片面を使用し、１行４０字（英語の場合には１行６０字）、１頁２５行で印刷すること。イタリック、ボールド、あるいはスモールキャピタルにする語句がある場合は、それぞれ赤字で下線、波下線、二重下線を記すこと。

（４） 略語リストがある場合には、本文第１頁に脚注として略語の項を設け表記すること。単位系と省略記号は SI 単位を基本とする。

（５） 生物の命名及び記載は International Code of Nomenclature of Prokaryotes, International Code of Botanical Nomenclature, International Code of Zoological Nomenclature に従う。学名が初出の場合は全部を記載すること。原則として、２回目以降は属名の頭文字を略号とするが、紛らわしい場合には省略せずに記載すること。

（６） 物質名の表記は以下の規定に従うこと。

１）有機化合物の表記および放射性同位元素による標識化合物の表記は IUPAC 規定に従うこと。

２） 生化学関連事項の命名は IUPAB 制定の命名法に従うこと。

３） 化学式に用いられる記号、略号などは Chemical Abstracts の用例に従うこと。

（７） 論文受理後、完成した本文および図表等の印刷に必要な全てのファイルを収めた電子媒体を編集委員長宛に郵送するか、またはそれらのファイルを e-mail 添付書類として編集委員長宛に送付すること。

２．投稿論文の構成

（１） 原著論文は 1)標題、2)アブストラクト、3)本文、4)引用文献、5)表ならびに図、図の説明文、の順にまとめること。

（２）標題は論文内容を具体的に表す簡潔なものとすること。標題の下に著者名、所属機関名、所在地を書く。著者が複数で、所属機関が異なる場合は、著者名末尾に上付数字を付けて区別するとともに、連絡対応著者名を指定すること。

（３）原著論文ならびに総説のアブストラクトは英語で記述するものとし、通常論文・総説では 200words 以内、短論文では 100words 以内で作成すること。

（４） 通常論文の本文は原則として、緒言、材料および方法、結果、考察（あるいは結果と考察）、謝辞で構成する。短論文では項目分けをしない。

（５） 原著論文ならびに総説では、必要に応じて図表を用いる。それぞれの図表を挿入したい位置を、原稿右側の余白部分に指示すること。

（６） 文中での文献の引用は、引用文献の項目で整理した文献番号を用いること。図表の引用はその番号によること。

（７） 脚注が必要な場合には、該当事項の右肩に通し番号を付け、当該頁の下部に説明文を付けること。

３．引用文献

（１） 引用文献は下記の例に準じ、本文中の該当人名あるいは事項の右肩に 1), 1-3)のように番号を付し、また、本文末尾の引用文献の項に第一著者のファミリーネームのアルファベット順に 1., 2., 3., --の番号を付し一括記載する。Ibid., idem は用いないこと。私信、未発表の研究結果、学術雑誌に受理される前の論文、抄録が印刷されていない口頭発表などは引用文献に含めないこと。雑誌の略号は、Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1907-1984 (Cumulative)およびその補遺版により、雑誌名、書名、年、巻および頁の示し方は下記によること。

（２） 雑誌引用のとき

Chuakrut, S., Arai, H., Ishii, M., and Igarashi, Y. 2000. Characterization of a bifunctional archaeral acyl coenzyme A carboxylase. J. Bacteriol. 185: 938~947.

（３） 書籍引用のとき

児玉徹. 1997. V 近代的な微生物利用工業１．アルコール, pp191~197.児玉徹・熊谷英彦編, 食品微生物学, 文永堂出版

４．表と図およびその説明

（１） 表と図は印刷版下を作成すること。

（２）本文を英語で書いた場合には図表も英文で作成すること。

（３） 表と図は一つに対して１頁使う。各頁の右上に著者名ならびに図の番号を入れること。

（４） 表題は表の上部分に書くこと。表の内容説明文ならびに注は、表の下に記述する。注の表示には a),b),c)を上付で明記し、記述には a),b),c)を上付にせず用いる。

（５）図の標題ならびに説明文は別紙にまとめて印刷すること。図の標題の最後にはピリオドを付し、内容説明は標題の後に改行して記載すること。

（６） 写真は明瞭な陽画を必要部数添付すること。

学会会則

極限環境生物学会会則

（名称）

第１条 本会は、極限環境生物学会（英文名：The Japanese Society for Extremophiles ）という。

（以下本会という）

（目的）

第２条 本会は、極限環境生物研究の発展に寄与し、極限環境生物の研究、教育、利用の推進に寄与することを目的とする。

（事業）

第３条 本会は、研究発表会及び講演会等の開催、極限環境生物学会誌（英名：Journal of Japanese Society for Extremophiles）の発行、国際極限環境生物学会等との連携事業、研究奨励賞・ポスター賞の授与、その他前条の目的を達成するために必要な事業を行う。

（会員の種別等）

第４条　本会の会員は正会員、名誉会員、団体会員および賛助会員とする。

2.正会員は極限環境生物に関する研究に従事する、または、これに関心を持つ個人であって、本会の目的に賛同し、定められた会費を納めた者をいう。身分が学生である者および 65 歳以上となった正会員の会費は別に定める。便宜上これらの者をそれぞれ正会員（学生）および正会員（シニア）と称する。

3.名誉会員は、当学会の発展に功労のあった者で、幹事会による推薦・選考を経た後、評議員会による承認を経て、会長により指名される。

4. 団体会員は極限環境生物に関心を持つ団体（法人等）であって、その団体内の本会の目的に賛同する代表者を含めて３名以内の所属者を指名して会員登録を行い、定められた会費を納めた団体をいう。

5. 賛助会員は本会の目的に賛同し、定められた賛助会費を１口以上納めた個人または団体をいう。
第５条 会員は本会が開催する諸事業に参加し、本会の発行する印刷物、PDF 等の配布を受けることができる。

（入会）

第６条 会員として入会しようとする個人または団体は、本会事務局が定める手続きに従って申し込みを行い、本会会長による承認を得なければならない。

（会費）

第７条　会員は下記の会費を納めるものとする。

正会員　　年額　5,000 円

（但し身分が学生である者および 65 歳以上となった正会員は申請により年額 2,000 円とすることができる。前者の場合は指導教員の署名、後者の場合は幹事会による事後承認を必要とする。）

名誉会員　年額　0 円

団体会員　年額　20,000 円

賛助会員　年額　一口以上（一口 30,000 円）

（退会）

第８条 会員は会長に届けることによって退会することができる。

（役員）

第９条　本会には会長 1 名、副会長 2 名、評議員若干名、幹事若干名、会計監査 2 名の役員をおく。

2. 会長は本会を代表し、会務を統括する。

3. 副会長は会長を補佐し、会長に事故ある場合には会長の職務を代行する。

4. 幹事は、幹事長、庶務、学術活動、会計、を分担し、事業計画の立案、事業の実施、庶務会計、シンポジウムの企画立案、学会誌発行、国際極限環境生物学会等との連絡などの本会の事務を行う。

5. 会計監査は本会の会計を監査する。

（役員の選出と任期）

第１０条　会長、副会長、評議員は本会の総会において選出される。

2. 幹事、会計監査は、副会長、評議員以外の正会員の中から会長が指名し、総会の承認を受ける。

3.　会長、副会長の任期は２年とし重任を妨げない。

4. 評議員の任期は２年とし重任を妨げないが、原則として連続 2 期を限度とする。但し、会長が指名する者はこの限りではない。

5. 幹事長の任期は 2 年とし重任を妨げない。

6. 庶務幹事の任期は 2 年とし重任を妨げないが、連続 2 期を限度とする。

7.　年会幹事の任期は 2 年とし 1 期限りとする。

8.　庶務幹事、年会幹事以外の幹事の任期は 2 年とし重任を妨げない。

（名誉会長）

第１１条　　本会には名誉会長をおくことができる。

2. 名誉会長は、本会に対し大局的な見地による適切な助言を与える。

3. 名誉会長は、会長として学会の運営及び発展に特別の功績があった者で、幹事会による推薦、評議員会を経て、総会の承認を受ける。

（委員会の設置と委員の任期）

第１２条　本会に学会誌編集委員会、研究奨励賞選考委員会、若手シンポジウム委員会を置く。

2. 学会誌編集委員会（会長指名の若干名で構成し、委員長は互選する）は学会誌の編集、論文審査の任にあたる。

3. 研究奨励賞選考委員会（副会長が委員長を務め、学術担当幹事と委員長指名の委員､計 10 名程度で構成する）は本会の研究奨励賞受賞者を選考する。

4. 若手シンポジウム委員会（会長指名の若干名で構成する）は学術担当幹事と共同でシンポジウムを企画立案し、運営をサポートする。委員の任期は 2 年とし 2 期限りとする。委員長は 2 期目の委員の中から互選する。

（評議員会）

第１３条　評議員会は会長、副会長、評議員をもって構成する。会長は年 1 回以上評議員会を召集し、議長となり､会の重要事項を審議し総会に提案する。

（総会）

第１４条　本会は原則として年 1 回総会を開き、会務を協議し議決する。
総会は会長が召集する。

第１５条　総会の議決は出席会員の過半数の賛成をもって行う。

（会計年度）

第１６条　本会の事業年度は 4 月 1 日に始まり、翌年 3 月 31 日に終る。

（付則）

第１７条　　本会則の施行および本会の運営についての細則は総会の議決を経て別に定める。

第１８条　　本会則の変更は総会の議決を経て行う。

第１９条　本会則は、1999 年 10 月 19 日より施行する。

2001 年 11 月 29 日改定
2002 年 12 月 1 日改定
2003 年 12 月 1 日改定
2005 年 11 月 7 日改定
2007 年 12 月 1 日改定
2010 年 1 月 1 日改定
2012 年 12 月 1 日改定
2013 年 10 月 26 日改定
2017 年 10 月 16 日改定
2018 年 12 月 8 日改定
2020 年 4 月 1 日改定

学会細則

極限環境生物学会細則

（会員）

第１条 入会を承認された正会員、名誉会員、団体会員、賛助会員は、所定の会費を速やかに納入する。

（総会）

第２条 総会の議案は副会長、幹事等と共に会長が作成し、評議員会の議を経た後提出する。議案には前年度の事業内容及び収支決算、新年度の事業計画、及び収支予算を含むものとする。

第３条 総会は会員の１／１０以上の出席（但し委任状を含む）をもって成立する。

（役員の選出）

第４条 会長、副会長、評議員は会員の選挙によって決められる。会長は選挙によらず評議員を指名することが出来るが、総会での承認を必要とする。

第５条 会長は会員の中から少なくとも３名を選んで選挙管理委員を委嘱する。選挙管理委員は選挙事務を行う。

第６条 会長は、評議員会の承認を得て必要な委員会を作ることが出来る。

（名誉会員）

第７条 名誉会員に推戴される者は、推戴される年の学会年度始まりにおいて、満 70 歳に達している会員とする 。

第８条 名誉会員の総数は、原則として会員総数の５％を目安とする。

第９条 名誉会員に推戴された者は、総会の席で、推戴の盾と記念品を贈呈される。

第１０条 名誉会員は当学会の催すシンポジウム・年会等に招待される。

（評議員会）

第１１条 評議員会は評議員の半数以上の出席（委任状を含む）をもって成立する。

第１２条 評議員会の決議は出席者の過半数の賛成により成立する。

（退会）

第１３条 会長は、会費を３年以上滞納した会員を退会させることが出来る。

（授賞）

第１４条 研究奨励賞・ポスター賞の授賞規定は別途定め全会員に配布する。

（細則の変更）

第１５条 本細則の変更は総会の議決による。

（付則）

第１６条 今期の本会事務局は、東洋大学 理工学部応用化学科 生命工学研究室 峯岸宏明研究室（埼玉県川越市鯨井） 内とする。

第１７条 本細則は、1999 年 10 月 19 日よりこれを実施する。

2002 年 12 月 1 日改定
2003 年 12 月 1 日改定
2006 年 6 月 30 日改定
2007 年 12 月 1 日改定
2010 年 1 月 1 日改定
2012 年 12 月 1 日改定
2017 年 7 月 21 日改定
2017 年 10 月 16 日改定
2019 年 11 月 17 日改定
2020 年 4 月 1 日改定

運営体制

極限環境生物学会運営体制（2020-2021 年度）

名誉会長	故 掘越 弘毅	

会長	大島 泰郎	共和化工株式会社 環境微生物学研究所
副会長	伊藤 俊洋	一般財団法人北里環境科学センター
	井上 明	東洋大学 バイオナノエレクトロニクス研究センター

評議員（５０音順、敬称略）	
石野 園子	九州大学大学院 農学研究院
板谷 光泰	慶応義塾大学 環境情報学部
石田 真巳	東京海洋大学 海洋環境学科
伊藤 佑子	創価大学 工学部
大島 敏久	大阪工業大学 工学部
鎌形 洋一	国立研究開発法人産業技術総合研究
川上 文清	B&I サポート
河原林 裕	次世代バイオ医薬品製造技術研究組
倉光 成紀	大阪大学大学院 理学研究科
小林 哲夫	名古屋大学大学院 生命農学研究科
芝 弘孝	サントリーMONOZUKURI エキスパート株式会
高井 研	国立研究開発法人海洋研究開発機構
中川 和倫	愛媛県立今治西高等学校
中島 春紫	明治大学 農学部
野尻 秀昭	東京大学 生物生産工学研究センター
長谷川 功	日本大学 生物資源科学部
早川 敦	味の素株式会社 バイオファイン研究所所
半澤 敏	東ソー株式会社
藤浪 俊	アメリエフ株式会社
藤原 伸介	関西学院大学 理工学部
藤原 健智	静岡大学 理学部
宮崎 健太郎	国立研究開発法人産業技術総合研究
森屋 利幸	共和化工株式会社
山岸 明彦	東京薬科大学 生命科学部
湯本 勲	国立研究開発法人産業技術総合研究
若木 高善	東京大学大学院 農学生命科学研究科
山岸 明彦	東京薬科大学 生命科学部
湯本 勲	国立研究開発法人産業技術総合研究
若木 高善	東京大学大学院 農学生命科学研究科

幹事会		
幹事長	中村 顕	筑波大学大学院 生命環境科学研究科
幹事会顧問	宇佐美 論	東洋大学 理工学部
	工藤 俊章	北里大学 生命科学部
庶務担当	道久 則之	東洋大学 生命科学部
	古園 さおり	東京大学 生物生産工学研究センター
編集委員長	石井 正治	東京大学大学院 農学生命科学研究科
編集副委員長	石野 良純	九州大学大学院 農学研究院
学会誌担当	古園 さおり	東京大学 生物生産工学研究センター
	相馬 亜希子	千葉大学大学院 園芸学研究科
	八波 利恵	東京工業大学 生命理工学院
M&E 誌担当	布浦 拓郎	国立研究開発法人海洋研究開発機構
会計担当	高品 知典	東洋大学 生命科学部
	峯岸 宏明	東洋大学 理工学部
ホームページ担当	三輪 哲也	国立研究開発法人海洋研究開発機構
	黄川田 隆洋	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機
年会担当	鴫 直樹	国立研究開発法人産業総合研究所
	荻野 博康	大阪府立大学大学院 工学研究科
学術担当	跡見 晴幸	京都大学大学院 工学研究科
	伊藤 隆	国立研究開発法人理化学研究所
	伊藤 政博	東洋大学 生命科学部
	折田 和泉	東京工業大学 生命理工学院
	加藤 千明	国立研究開発法人海洋研究開発機構
	國枝 武和	東京大学大学院 理学系研究科
	栗原 達夫	京都大学 化学研究所
	郷田 秀一郎	長崎大学 工学部
	小西 正朗	北見工業大学 工学部
	仲宗根 薫	近畿大学 工学部
	東端 啓貴	東洋大学 生命科学部
	福居 俊昭	東京工業大学 生命理工学院
	若井 暁	神戸大学 自然科学系先端融合研究環
会計監査	中村 聡	東京工業大学
	鳴海 一成	東洋大学 生命科学部

若手シンポジウム委員会		
委員長	郷田 秀一	創価大学 理工学部
委員	佐藤 喬章	京都大学大学院 工学研究科
	川本 純	京都大学 化学研究所
	Oleg Gusev	国立研究開発法人理化学研究所
	秀瀬 涼太	神戸大学大学院
	加藤 慎吾	国立研究開発法人理化学研究所
	亀谷 将史	東京大学大学院 農学生命科学研究科
	大平 高之	東京大学大学院 工学系研究科

極限環境生物学会
Extremophiles

編集委員会
委員長　：石井正治（東大）
副委員長：石野良純（九大）
学会誌担当：古園 さおり（東大）、相馬 亜希子（千葉大）、八波 利恵（東工大）

学会事務局
〒350-0815 埼玉県川越市大字鯨井２１００
東洋大学 理工学部 応用化学科 生命工学研究室 峯岸宏明研究室内
極限環境生物学会事務局　中村　顕　(幹事会幹事長)
E-mail: kyokugenjm10@extremophiles.jp
URL: http://www.extremophiles.jp/

学会誌編集
山本まみ

発刊日　2020 年 3 月 31 日