

極限環境微生物とその利用

立命館大学 生命科学部 教授 今中 忠行

生物の分類

生物を分類する基準として、永らく①形や大きさなどの形態学的基準と、②基質や生産物など代謝的特徴をふまえた生理学的基準が用いられてきたが、遺伝子工学の発展をもとに16S rRNA(真核生物では18S rRNA)などの特定遺伝子の塩基配列を比較する③遺伝学的基準が採用され現在に至っている。現在のすべての生物は細菌、始原菌、真核生物の3つのドメインに分けられる(図1)(1)。もちろん細菌、始原菌は原核生物であり、始原菌から真核生物が進化してきたと考えられている。また生命の源流は超好熱菌であり一般的に高温、嫌氣的条件下で生育する特徴をもつ。

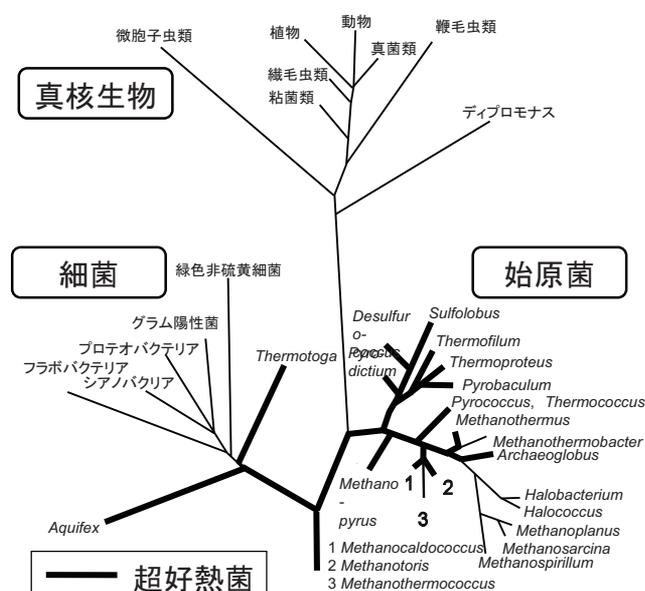


図1. 全生物の進化系統樹

好熱菌の発見

1980年代前半、ドイツのK. Stetterらを中心に100℃以上でも生育する微生物が分離された(2)。その後も高温環境で生育する微生物の分離が続けられているが、これらは既存の好熱菌よりさらに高い温度域で生育することから超好熱菌(hyperthermophile)と呼ばれている。

現在、超好熱菌とは、一般に90℃以上で生育する微生物、あるいは至適生育温度が80℃以上の微生物として定義されている。すでにこの定義に当てはまる微生物は100種以上分離・同定されており、122℃が今までの生育最高温度として報告されている(3)。

超好熱菌は、二つの観点からとくに注目を集めている。一つは超好熱菌が進化系統樹の源流に位置するので、生物進化の流れを理解するために重要であること。もう一つは、それらが生産するタンパク質が高い耐熱性あるいは好熱性を示すという点で、従来の酵素と比べて広い温度範囲で長期間使用可能なことから、新しい技術開

発や産業プロセスへの応用が期待できることである(4)。

われわれは、鹿児島県小宝島の硫黄坑から100℃でも生育できる超好熱始原菌*Thermococcus kodakaraensis* KOD1(図2)を分離し、多くの耐熱性酵素について検討してきた。ここでは、耐熱性DNAポリメラーゼの利用について述べてみたい。

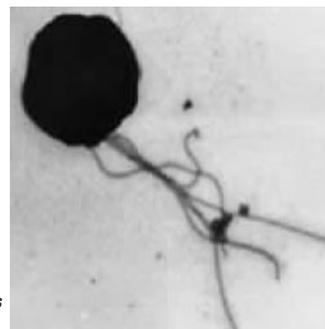


図2. *Thermococcus kodakaraensis* KOD1の電子顕微鏡写真

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法の開発

シータス社のK. MullisがPCR法を開発(5)してから四半世紀が経った。簡単に遺伝子の特定領域を100万倍以上に増幅できるこの技術は、微量遺伝子の検出など生命科学の研究に不可欠な技術であるだけでなく、法医学、親子鑑定、環境中の微生物モニタリング、食品工場での雑菌汚染の早期発見など応用面でも幅広く利用されている。彼はこの業績が認められて1993年にノーベル賞を受賞している。PCR法の概略を示したのが図3である。①まず95℃程度の高温で二本鎖DNAを一本鎖に解離(変性)させ、②その後55~60℃でプライマー(別途化学合成した相補的オリゴヌクレオチド)を結合させ(このプロセスを「アニーリング」という)、③最後に60~72℃でDNA鎖の伸長反応が進む。この3つの工程を25~30回繰り返すことにより試料DNAを指数関数的に増幅させることができる。厳密に言えば、両末端が整った目的一本鎖断片が生じるのは2サイクル目を終了した時点であり、3サイクル目から目的二本鎖断片が指数関数的に増えることになる。最終的に電気遊動で単一バンドが目視できるまでに増幅(100倍以上)されることになる。開発当初は大腸菌のDNAポリメラーゼが使われていたが、高温処理が含まれているためサイクル毎に酵素を添加する必要があった。この煩雑さから逃れるために、耐熱性のDNAポリメラーゼが利用されるようになったのである。

PCRをうまく行うためには、サイクル数、温度、時間、プライマー、緩衝液など、それぞれについて最適な条件を検討する必要がある。おおよその指標として、DNA増幅が認められない場合には、アニーリング温度を下げる、反応時間を延ばす、熱変性時間を長くするなどの方法が有効である。

一方、目的のDNA以外の非特異的な増幅が認められる場合には、アニーリング温度を上げる、合成時間を短くする、プライマーのデザインを変更する(繰り返し配列を避ける)などの方法が有効である。これらの方法でも改善が認められない場合には、緩衝液中のMgイオン濃度を変化させる(1~6mM)とよい結果が得られる場合がある。

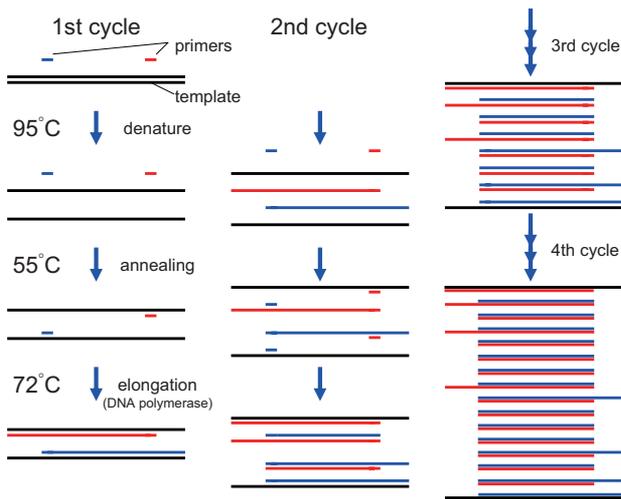


図3. PCR法の実際

DNAポリメラーゼの種類

PCRは優れた遺伝子増幅方法であるが、前述のように増幅が認められない、あるいは非特異的増幅などのトラブルはもちろんのこと、反応速度や正確性などにおいて改善すべき点も多く残されている。

反応条件の至適化だけでなく、酵素であるDNAポリメラーゼを改良する試みも多くなされてきた。PCR用酵素として使用されているDNAポリメラーゼは、細菌由来のPol I型酵素と、始原菌由来DNAポリメラーゼを含む α 型酵素に大きく分けることができる。

Taq DNAポリメラーゼに代表されるPol I型酵素は、DNA合成活性が高いが、校正機能としての3'→5'エキソヌクレアーゼ活性がない場合が多く、増幅の際の正確性に問題がある。

α 型酵素は強い3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有しており、正確な増幅反応をおこなえるが、一般的に伸長活性は低い場合が多い。したがって目的に応じた酵素の使用が望ましい。

KOD1株の耐熱性DNAポリメラーゼとその特性

好熱菌の酵素なら耐熱性が高いはずであると考え、シータス社が *Thermus aquaticus* のポリメラーゼをTaqポリメラーゼとして最初に商品化した。しかしこのTaqポリメラーゼは伸長反応の速度は速いが、エキソヌクレアーゼ活性が低いため校正機能が弱く、忠実度（正確性）が悪いという欠点がある。そこで *Thermus* よりさらに高温（90℃以上）で生育する超好熱菌が探索され、始原菌（アーキア）に属する *Pyrococcus furiosus* の酵素（Pfuポリメラーゼ）が商品化された。この酵素は、Taqポリメラーゼと比較して、耐熱性は高く忠実度も良いのだが、合成速度が遅いという欠点があった。

そこで私たちは、新たに超好熱菌を自然界から分離し、より良質のポリメラーゼを探索することにした。鹿児島県小宝島の硫気坑から超好熱性始原菌を分離し、*Thermococcus kodakaraensis* KOD1と名付けた(6,7)。本菌のDNAポリメラーゼ（KODポリメラーゼ）遺伝子の構造(8)を図4に示す。ポリメラーゼ構造遺伝子の中にin frameで2つのインティンが含まれていた(9)。この遺伝子が転写・翻訳されて大きなポリペプチドが合成され、自発的に折りたたまれた際にタンパク質スプライシングが起こり、2つのエンドヌクレアーゼが生じる。その時に、ポリメラーゼ部分（3つの赤色のペプチド部分）が自動的に連結され正常なKODポリメラーゼが生成

されることが判明した。そこで、赤色の3つの遺伝子部分のみを連結させた（2つのエンドヌクレアーゼ部分を除去した）ポリメラーゼ遺伝子を構築し、以後の実験に供した。この遺伝子を宿主である大腸菌内でクローニングし、大量発現させた後、菌体を破碎し、高温処理をすれば、ほとんどのホストたんぱく質は熱変性して沈殿し、耐熱性のポリメラーゼは溶解したままなので、精製が容易である。このあとイオン交換カラムクロマトグラフィーにかければ、ほぼ純品の酵素が得られる。

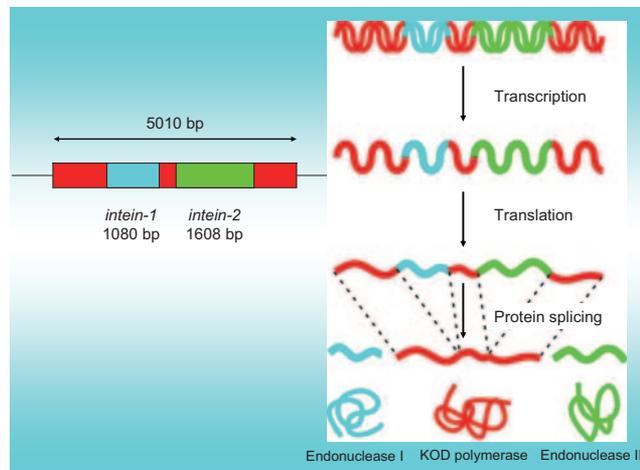


図4. KOD1株のDNAポリメラーゼ遺伝子

KODポリメラーゼについて、PCRに使う場合の諸特性を他の市販されている酵素と比較したのが図5である。本酵素は、より長く、より速く伸長反応が進み、最も忠実度が高い（正確な）という三冠王の酵素であることが明らかになった(10,11)。

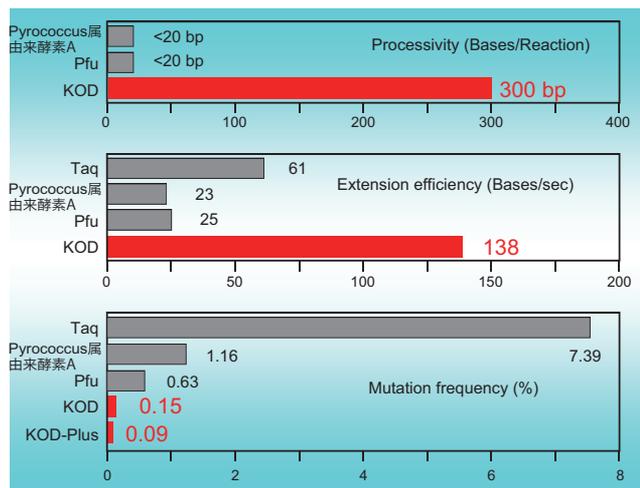


図5. KOD DNAポリメラーゼのPCRにおける性能比較

DNAポリメラーゼの立体構造

KODポリメラーゼの結晶が得られたので、X線回折によりこの立体構造を決定した(図6)(12,13)。ポリメラーゼ活性領域を示したのが図7である。活性中心は3つのアスパラギン酸で構成されており、その近傍にはリジンやアルギニンの正荷電アミノ酸が壁を成している。DNA合成反応の基質は負荷電のヌクレオシド三リン酸であるから、正荷電の壁の方へ容易に近づくことができ、局部的に基質濃度が高くなるために、反応が早く進むのであろう。エキソヌクレアーゼ活性領域を示したのが図8である。この図のフォークポイントには7つのアルギニン残基がある。他の同種酵素で7つあるも

のはまだ見つかっていない。DNAは当然負に荷電しているから、正に荷電しているアルギニンとはうまく認識し合って長いDNA合成が可能になっているものと考えられる。またこのアルギニンの一つを他のアミノ酸に置換すると忠実度が低下するので、正確性も7つのアルギニン残基のお陰であろう。また酵素の立体構造に基づいて、ポリメラーゼ活性と校正機能の協働作用を論じることができるのも構造生物学の利点であろう(14)。

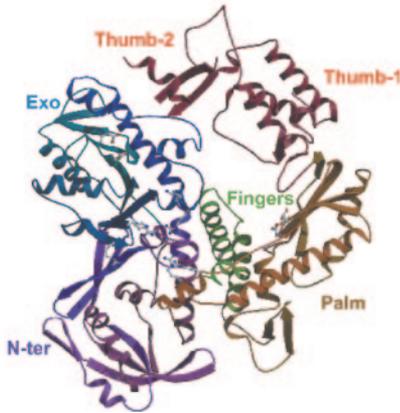


図6. KOD DNAポリメラーゼの立体構造

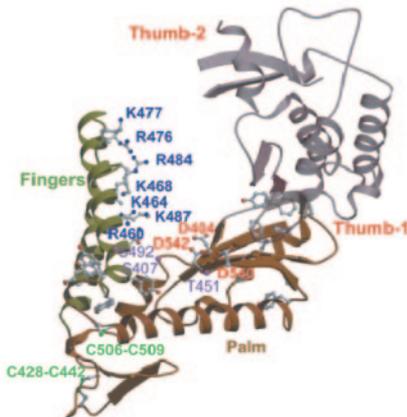


図7. KOD DNAポリメラーゼのポリメラーゼ領域

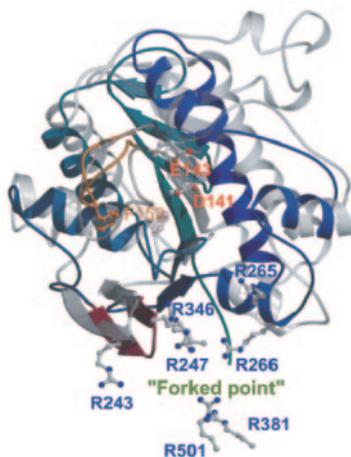


図8. KOD DNAポリメラーゼのエクソヌクレアーゼ領域

ホットスタートPCR

通常のPCRを行うと、最初の昇温時にどうしてもミスマッチプライマーのアニーリングやプライマーダイマーが生じてしまい、目的外のDNA断片が増幅されることがある。そこで、最初の昇温時にDNAポリメラーゼの活性をマスクし、高温になってからPCRがスタートするようにすれば、上述の問題を回避することができる。これがホットスタートPCRである(図9)。

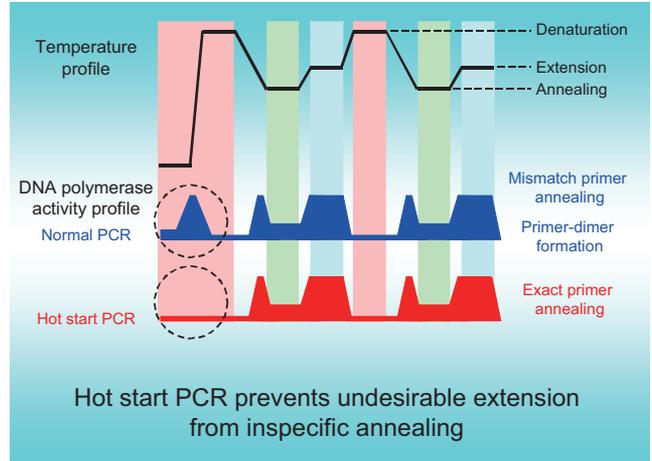


図9. ホットスタートPCRの特性

われわれはまず抗DNAポリメラーゼモノクローナル抗体を製し、その中から酵素活性を阻害する抗体を選択することにした。まず精製したKODポリメラーゼを用いてマウスを免疫し、その脾臓細胞(抗体を生産することができるが、増殖し続けることができない)と、抗体は作れないが増殖し続けることができる癌細胞を融合させ、抗体産生能力があり増殖することができるハイブリドーマを16株得た(15)。それぞれが独自のモノクローナル抗体を産生するので、それぞれがポリメラーゼ活性を阻害するかどうかを調べた。特に阻害度が強力な2種の抗体が得られたので、それらについてエピトープ解析を行った。すなわち、抗体が抗原タンパク質のどの位置に結合しているのかを調べたのである。3G8抗体はDNAポリメラーゼ活性を示す保存領域に結合し、βG1抗体は3'→5'エキソヌクレアーゼ活性の保存領域に結合することが明らかになった。2つの抗体を同時に添加すると、低温域ではポリメラーゼ活性をほぼ完全に阻害し、高温域になるとマウス由来のタンパク質であるため熱変性してポリメラーゼからはずれて酵素活性が回復する(図10)。商品化したキット(KOD-Plus-)には、これらのモノクローナル抗体が添加されている。

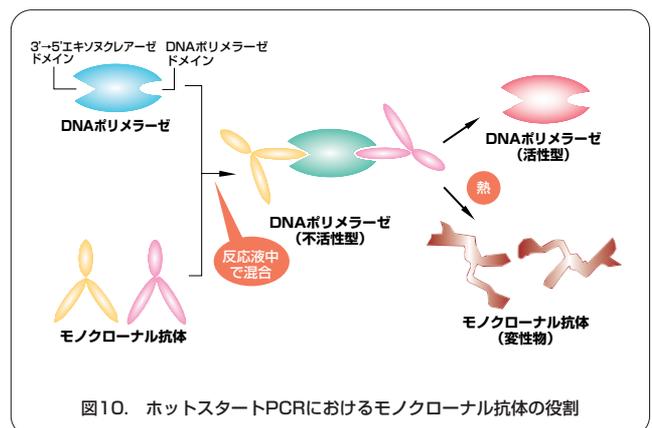


図10. ホットスタートPCRにおけるモノクローナル抗体の役割

KOD FXの凄さ

KODポリメラーゼの特性はいろいろな人からも指摘されてきた。例えば理化学研究所の林崎氏は、いろいろな生物種の遺伝子を紙に浸み込ませたDNA bookを作られたが、そこからPCRで遺伝子増幅できるのはKODポリメラーゼだけであるといわれた。また感染症研究所で出されている病原菌の検出マニュアルの中で、わざわざKODポリメラーゼでPCRを行うように記載されている例もある。さらには最近では、高性能PCR試薬としてKOD FXが開発され、東洋紡(株)から発売されている。その特徴は、①高い成功率、②抜群の増幅効率、③優れた伸長性(増幅可能鎖長)、④高い正確性、である。さらにこの酵素は、血液、マウス睾丸ライゼート、植物抽出液などの天然試料についてDNAを抽出することなく、そのままPCRにかけることが可能である。また通常はDNAを抽出しがたい酵母やカビなどのコロニーPCRも簡単に行えるし、GC含量が90%以上のプライマーを使用してもPCRが可能である。このような特徴は他の酵素では不可能であるため、多検体試料を高速処理するために必要な自動化などの場合には、その有用性が際立つことであろう。

実施例につきましては、オンラインUpload vol.99をご覧ください

参考文献

- 1) 工学系のための生化学 左右田健次・今中忠行・谷澤克行 編著 化学同人 2012
- 2) Stetter K: *Nature*, **300**, 258-260 (1982)
- 3) Takai K, Nakamura K, Toki T, Tsunogai U, Miyazaki M, Miyazaki J, Hirayama H, Nakagawa S, Nunoura T, Horikoshi K: *Prod. Natl. Acad. Sci. USA*, **105** (31), 10949-10954 (2008)
- 4) 跡見晴幸, 今中忠行: *生化学* **75**, 561-575 (2003)
- 5) Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H: *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **51** (Pt 1), 263-273 (1986)
- 6) Morikawa M, Izawa Y, Rashid N, Hoaki T, Imanaka T: *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 4559-4566 (1994)
- 7) Atomi H, Fukui T, Kanai T, Morikawa M, Imanaka T: *Archaea*, **1**, 263-267 (2004)
- 8) Takagi M, Nishioka M, Kakihara H, Kitabayashi M, Inoue H, Kawakami B, Oka M, Imanaka T: *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 4504-4510 (1997)
- 9) Nishioka M, Fujiwara S, Takagi M, Imanaka T: *Nucleic Acids Res.*, **26**, 4409-4412 (1998)
- 10) Nishioka M, Mizuguchi H, Fujiwara S, Komatsubara S, Kitabayashi M, Uemura H, Takagi M, Imanaka T: *J. Biotechnol.*, **88**, 141-149 (2001)
- 11) Imanaka T, Takagi M: *J. Chin. Inst. Chem, Engrs.* **32**, 277-288 (2001)
- 12) Hashimoto H, Matsumoto T, Nishioka M, Yuasa T, Takeuchi S, Inoue T, Fujiwara S, Takagi M, Imanaka T, Kai Y: *J. Biochem.*, **125**, 983-986 (1999)
- 13) Hashimoto H, Nishioka M, Fujiwara S, Takagi M, Imanaka T, Inoue T, Kai Y: *J. Mol. Biol.*, **306**, 469-477 (2001)
- 14) Kuroita T, Matsumura H, Yokota N, Kitabayashi M, Hashimoto H, Inoue T, Imanaka T, Kai Y: *J. Mol. Biol.*, **351**, 291-298 (2005)
- 15) Mizuguchi H, Nakatsuji M, Fujiwara S, Takagi M, Imanaka T: *J. Biochem.*, **126**, 762-768 (1999)



経歴

1967年 大阪大学工学部醸酵工学科卒業
1969年 同大学院工学研究科醸酵工学専攻修士課程修了
1969年 同大学院工学研究科醸酵工学専攻博士課程中退
1973年 工学博士
1989年 大阪大学工学部教授
1996年 京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻教授
2004~2005年 第46次南極地域観測隊員
2008年 京都大学名誉教授(現職)
2008年 立命館大学生命科学部生物工学科教授(現職)

日本醸酵学会斉藤賞、日本生物工学会論文賞、日本生物工学会生物工学賞、有馬啓記念バイオインダストリー協会賞、日本化学会賞、環境バイオテクノロジー学会賞受賞、紫綬褒章受章
アメリカ微生物学アカデミーフェロー、20期・21期日本学術会議会員、日本化学会フェロー