

論文内容の要旨

地球は太陽系唯一の「水の惑星」といわれるように、その表面の約70%は海で覆われている。水産学あるいは海洋科学の研究フィールドの大部分は言うまでもなくこの海洋である。実は、海洋は、浅い海よりもむしろ深い海、すなわち、深海の部分の方が圧倒的に大きい。今、便宜上、深海を水深1,000 m以深と定義した場合、深海は、海の面積で88%、体積で75%を占める。さらに、地上の生物圏も含めた地球の全生物圏に占めるその割合は62%もある。一方、海の平均の水深は約3,800 mである。言い換えれば、地球の生物圏の62%が平均で約380気圧もの高圧下にあり、残り38%が大気圧下あるいはそれ以下の圧力下にあるということになる。

このように、地球の生物圏の6割以上を占めるこの深海の高圧下にも実に様々な生物、例えば、マッコウクジラから微生物までが生息し、食物網等を通じて地球規模的な物質循環や環境問題に少なからず役割を果たしてきている。したがって、この広大な深海に生息する生物とその現場の高圧との関係に関する研究の意義は大きいと考えられる。しかしながら、21世紀に入った現在でも、実際の実験の困難さから、この分野の研究は余り行われてきていない。特に、深海好圧細菌（大気圧下よりも加圧下でより良く増殖する細菌）の酵素に関する研究は皆無に等しい。

そこで、本論文では、生物と圧力の研究の端緒として、深海好圧細菌の酵素の深海環境への適応機構の解明を目的に、深海好圧細菌の酵素のアミノ酸配列中に大気圧に適応した細菌株のアミノ酸配列とは異なった特異的な変異が存在するかどうかを検討し、見つけた変異部位において部位特異的な変異を行い、得られた野性型酵素と変異型酵素の性状を比較することにより、その部位のアミノ酸残基と高圧低温の深海環境でのこれら酵素の機能との関連を明らかにしようとしている。

第1章の序論に続き、第2章では、水深約3,100~6,100 mの深海から採取された深海性魚類、シンカイヨロイダラ (*Coryphaenoides yaquinae*)、ヨロイダラ (*Coryphaenoides armatus*)、そしてホラアナゴの類 (*Ilyophis* sp.) の腸内容物から分離された深海細菌のストックカルチャーから選んだ38株の16S rRNA 遺伝子 (約1,500 b. p.) をクローニングおよびシーケンシングし、この遺伝子の塩基配列に基づきこれら菌株の系統分類学的解析を行っている。その結果、これらの菌株は、4つの属、*Moritella* 属、*Shewanella* 属、*Halomonas* 属、そして *Pseudoalteromonas* 属に分類された。特に、すべての好圧菌株は、*Moritella* 属と *Shewanella* 属に属していた。*Moritella* 属のクラスターでは、深海性魚類腸内容物から分離された19株は、深層水、泥、堆積物の試料および大西洋サケから分離された参考株6株 (*Moritella* sp. SC20 株、*Moritella* sp. 5710 株、*Moritella marina* ATCC15381、*Moritella yayanosii* DB21MT-5 株、*Moritella viscosa* NV188/478 株、*Moritella japonica* DSK1 株) とは異なるサブクラスターを形成した (ただし、参考株 *Moritella* sp. 5710 株は、独立行政法人理化学研究所の大熊盛也氏が分離し、独立行政法人海洋研究開発機構の能木裕一氏から分与された菌株で、分離当初は *Vibrio* sp. 5710 株と報告されていた。しかし、本論文で、16S rRNA 遺伝子の塩基配列から本菌株は

氏名	さいとうりえ 齋藤理恵
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農第79号
学位授与の日付	平成17年3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Studies on malate dehydrogenases of piezophilic bacteria isolated from intestinal contents of deep-sea fishes
論文審査委員 (主査)	教授 中山 昭彦
(副主査)	教授 深 溝 慶
(副主査)	教授 江 口 充

*Moritella* 属に分類された)。深海環境では、深海性魚類の腸内は、まわりの有機物の少ない深層水や深海堆積物と比較して、例外的に有機物の多い微生物の生息場所である。この二つの生息場所の有機物濃度の顕著な相違が微生物の変異速度に影響したのかもしれない。進化という時間スケールで見ると、このような変異速度の相違が進化速度に影響し、著者らの腸内細菌株と参考株との間の系統分類学的違いを生じたのではという仮説を可能性の一つとして考えている。さらに、深海性魚類の腸内容物から Marine Broth 2216 (Difco) のような比較的有機物濃度が高い培地を用いて好気条件下で細菌が分離された場合、*Moritella* 属の菌株が最も多く分離され、次に *Shewanella* 属の菌株が分離されることを明らかにしている。

第3章では、深海性魚類腸内容物から分離された菌株中、第2章の系統樹で、*Moritella* 属に分類された19株から12株と *Shewanella* 属に分類された7株から3株、および参考株として、*Moritella* sp. 5710 株と、*Moritella marina* ATCC15381、*Moritella japonica* DSK1 株、そして *Moritella yayanosii* DB21MT-5 株の3株（独立行政法人海洋研究開発機構の加藤千明氏からゲノム DNA の状態で提供された）の計19株の MDH 遺伝子をクローニングおよびシーケンスし、その推定されたアミノ酸配列を proteobacteria の  $\gamma$ -subclass に属する菌株の MDH の既知のアミノ酸配列と比較している。その結果、深海性魚類腸内容物から分離された好圧性 *Moritella* 属および *Shewanella* 属の菌株の MDH は、それぞれ312および311のアミノ酸残基からなっていた。これら15株は、第2章の系統解析ではすべて異なる菌株であったが、MDH のアミノ酸配列としては10種類の配列が得られた。参考株4株では、その MDH のアミノ酸配列は全て異なっていた。*Moritella* 属の菌株の MDH のアミノ酸配列中の非共通部位は、312のアミノ酸残基中26部位であった。また、配列間の相同性は非常に高く91.7%以上であった。*Shewanella* 属の菌株の MDH のアミノ酸配列中の非共通部位は、311のアミノ酸残基中40部位であった。また、配列間の相同性は非常に高く87.1%以上であった。

大気圧適応細菌株との比較から、深海性魚類腸内容物から分離された好圧性 *Moritella* 属および *Shewanella* 属の MDH のアミノ酸配列中に、特異的なアミノ酸置換をそれぞれに4ヶ所および5ヶ所見つけている。また、ホモロジー・モデリングによると、これらの置換のほとんどは分子の表面領域に存在しているように思われた。以上の結果は、属が異なると MDH の高圧低温の深海環境への適応戦略が異なる可能性を示している。さらに、好圧性 *Moritella* 属の MDH に特異的に見られた4箇所のアミノ酸置換の内の1箇所である229番目のアミノ酸 His はホモダイマーである MDH のサブユニット相互作用部位に位置していることが分かった。一方、好熱細菌の酵素の研究ではサブユニット相互作用は安定なダイマー構造と熱安定性に重要であることがすでに知られていた。そこで、この His-229 は *Moritella* 属の好圧細菌の MDH が高圧低温の深海環境で機能する場合に重要となるアミノ酸残基であろうと推測し、今後の研究はこの *Moritella* 属の MDH の His-229 に注目して行っている。

第4章では、第3章でのこの推測を確認するために、同属の *Moritella* 属の菌株で、生息水温がほぼ同じで生息水深（水圧）のみが異なる2株、水深6,100 m で採取されたシンカイヨロイダラの腸内容物から分離された偏性好圧細菌 *Moritella* sp. 2D2 株および水深2,220 m で採取された堆積物から分離された好冷細菌（大気圧適応細菌）*Moritella* sp. 5710 株、を選択している。すなわち、偏性好圧細菌 *Moritella* sp. 2D2 株をはじめ実験した全ての *Moritella* 属の好圧細菌の MDH の229番目は His に置換されていたが、好冷細菌 *Moritella* sp. 5710 株をはじめ Proteobacteria の  $\gamma$ -subclass に属する菌株の MDH の既知のアミノ酸配列では、229番目のアミノ酸は完全に保存され Gln であった。次に、選択された *Moritella* sp. 2D2 株と *Moritella* sp. 5710 株のそれぞれクローニングされた MDH の遺伝子に、部位特異的突然変異法を用い、*Moritella* sp. 2D2 株の MDH の His-229 を Gln に、*Moritella* sp. 5710 株の Gln-229 を His に置換した組換え変異型タンパクを調製している。このようにして得られたそれぞれの野生型と変異型タンパクを用い、その熱安定性、 $K_m$ 、および  $k_{cat}$  を MDH 活性と円偏光二色性 (CD) スペクトルによる構造解析とから比較検討している。その結果、*Moritella* sp. 2D2 株の MDH は変異が入ると熱安定性は低下したが、*Moritella* sp. 5710 株の MDH は変異が入ると熱安定性が上がった。この実験結果は、CD を指標として求めたこれら MDH の  $T_m$  (熱安定性) の結果、すなわち構造変化からも支持された。加圧下 (62.1 MPa) で測定された  $K_m$  および  $k_{cat}$  は、いずれの MDH においても229番目のアミノ酸残基が His の場合より大きい値を示した。すなわち、加圧下では、229番目の His 残基は、NADH 結合部位にマイナスの効果を、また活性部位にはプラスの効果を、それぞれ及ぼしていると考えられた。しかし、大気圧下では、特に、*Moritella* sp. 2D2 株の MDH においては、そのような His-229 の効果は見られなかった。さらに、高圧下では現在のところ CD スペクトルの測定は不可能であるため大気圧下での測定を余儀なくされているが、それぞれの酵素の野生型と変異型の CD スペクトルは、それぞれの酵素の野生型と変異型の  $K_m$  および  $k_{cat}$  の変化の傾向とは矛盾しないものであった。すなわち、活性からみた変異の影響の結果は、CD スペクトルによる構造変化からみた変異の影響の結果によっても支持されていた。

以上の結果から、第5章では、*Moritella* sp. 2D2 株の MDH の229番目の His は、本酵素の熱安定性と深海の高圧低温下での機能に何らかの役割を果たしていると推定されると結論している。一般に、好冷細菌の酵素は、低温下で高い触媒活性を示すために比較的熱安定性がないと考えられている。最近、低温での高い触媒活性を維持しながら比較的熱安定性のある酵素への変換はタンパク工学的に可能なことが示されたが、この両方の性質を併せ持つ酵素は天然からまだ発見されていない。今回、本論文で研究された *Moritella* sp. 2D2 株の MDH は、天然から発見された両方の性質を合わせ持つ初めての酵素である可能性が大きい。

## 論文審査結果の要旨

深海は、地球の生物圏の62%を占め、平均水圧が380気圧以上もの高圧かつ低温の極限環境であり、21世紀の現在においても地球上に残された最後のフロンティアの一つである。このように地球の生物圏のかなりの部分を占める深海に生息する生物に関する研究、すなわち、その特徴である深海の高圧と生物の機能に関する研究は、地球規模的な物質循環や環境問題を考える上で必須である。しかし、現在まで、深海からの試料の採取や高圧下での実験の困難さから、これらの研究は極限られた分野のみにとどまっており、特に、深海好圧細菌の酵素に関する研究は皆無に等しい。

以上のような背景から、本論文では、既知のアミノ酸配列情報が多いリンゴ酸デヒドロゲナーゼ (MDH) をモデル酵素とし、深海好圧細菌のMDHの深海環境への適応機構の解明を目的に、深海好圧細菌のMDHのアミノ酸配列と大気圧に適応した細菌のそれとを比較し、深海好圧細菌に特異的なアミノ酸置換の探索から研究を始めている。次に、見つけた特異的なアミノ酸置換と本酵素の深海の高圧低温での機能との関連を実験的に明らかにするため、深海好圧細菌の代表株の偏性好圧細菌株と大気圧適応株の代表株の好冷細菌のそれぞれのMDHに部位特異的な変異を行い、野生型酵素と変異型酵素の性状を大気圧下と現場の高圧下で比較し、その部位が本酵素の高圧低温の深海環境での機能に何らかの役割を果たしていることを明らかにしている。

本論文では、深層水、深海底泥、深海堆積物、ヨコエビ類試料から分離された菌株による現在までの深海好圧細菌の研究と異なり、水深約3,100~6,100 mの深海から採取された深海性魚類 [シンカイヨロイダラ (*Coryphaenoides yaquinae*)、ヨロイダラ (*Coryphaenoides armatus*)、そしてホラアナゴの類 (*Ilyophis* sp.) ] の腸内容物から分離された菌株 (ストックカルチャー) を用いて研究を進めている。まず、この腸内細菌株のストックカルチャーから選んだ38株を16S rRNA 遺伝子 (約1,500 b. p.) 塩基配列に基づき系統分類学的解析し、これら菌株は、4つの属、*Moritella* 属、*Shewanella* 属、*Halomonas* 属、そして *Pseudoalteromonas* 属に分類され、特に、すべての好圧菌株は *Moritella* 属と *Shewanella* 属に属することを明らかにし、深海性魚類の腸内容物から Marine Broth 2216 (Difco) のような比較的有機物濃度が高い培地を用いて好気条件下で分離された場合、*Moritella* 属の菌株が最も多く分離され、次に *Shewanella* 属の菌株が分離されることを示している。

この腸内細菌株中、*Moritella* 属に分類された19株から12株と *Shewanella* 属に分類された7株から3株、および参考株として、*Moritella* sp. 5710 株、*Moritella marina* ATCC 15381、*Moritella japonica* DSK1 株、そして *Moritella yayanosii* DB21MT-5 株の4株の計19株のMDHのアミノ酸配列を proteobacteria の  $\gamma$ -subclass に属する細菌株のMDHの既知のアミノ酸配列と比較し、腸内細菌株の好圧性 *Moritella* 属および *Shewanella* 属の菌株のMDHのアミノ酸配列に特異的なアミノ酸置換をそれぞれ4ヶ所および5ヶ所発見している。これらの結果は、属が異なるとそのMDHの高圧低温の深海環境への適応戦略が異なることを示唆している。さらに、好圧性 *Moritella* 属のMDHに特異的に見られた4箇所のアミノ酸置換の内の1箇所である229番目のアミノ酸 His はホ

モダイマーであるMDHのサブユニット相互作用部位に位置していた。一方、好熱細菌の酵素の研究ではサブユニット相互作用は安定なダイマー構造と熱安定性に重要であることがすでに知られていた。そこで、この His-229 は *Moritella* 属の好圧細菌のMDHが高圧低温の深海環境で機能するのに重要なアミノ酸残基であろうと推測し、以後この部位に焦点を絞っている。

以上の推測の確認のために、同属の *Moritella* 属の菌株で、生息水温がほぼ同じで生息水深のみが異なる2株、水深6,100 mで採取されたシンカイヨロイダラの腸内容物から分離された偏性好圧細菌 *Moritella* sp. 2D2 株および水深2,220 mで採取された堆積物から分離された好冷細菌 (大気圧適応細菌) *Moritella* sp. 5710 株、を選択している。すなわち、偏性好圧細菌 *Moritella* sp. 2D2 株をはじめ実験された腸内好圧性 *Moritella* 属の菌株ではそのMDHの229番目はすべて His に置換されていたが、好冷細菌 *Moritella* sp. 5710 株をはじめ Proteobacteria の  $\gamma$ -subclass に属する菌株のMDHの既知のアミノ酸配列では、229番目のアミノ酸は完全に保存され Gln であった。そこで、*Moritella* sp. 2D2 株のMDHの His-229 を Gln に、および *Moritella* sp. 5710 株の Gln-229 を His に、置換した組換え変異型MDHと野生型MDHを調製し、それらMDHの熱安定性、 $K_m$ 、および  $k_{cat}$  をMDH活性と円偏光二色性 (CD) スペクトルによる構造解析から比較検討している。その結果、*Moritella* sp. 2D2 株のMDHは変異が入ると熱安定性は低下し、逆に *Moritella* sp. 5710 株のMDHは変異が入ると熱安定性が向上した。加圧下では、いずれのMDHにおいても、His-229はNADH結合部位と基質結合部位にそれぞれマイナスの効果とプラスの効果とを及ぼしたが、大気圧下では、特に、*Moritella* sp. 2D2 株ではそのような効果はなかった。CDを指標として求めた熱安定性 ( $T_m$ ) の結果は、活性から求めた各酵素の変異の影響の結果と一致した。また、それぞれの酵素の野生型と変異型のCDスペクトルは、それぞれの酵素の野生型と変異型の  $K_m$  および  $k_{cat}$  の傾向とは矛盾しないものであった。

以上の結果から、*Moritella* sp. 2D2 株のMDHの229番目の His は、本酵素の熱安定性と深海の高圧・低温下での機能に何らかの役割を果たしていると推定されると結論している。申請論文で行われた深海性魚類腸内好圧細菌に関する研究は、現在まで全く研究がなされていない分野であり、示された結果はすべて興味ある新規な成果であり今後の深海好圧細菌の研究に寄与するところが大きいと期待される。特に、今まで明らかにされたいなかった深海好圧細菌酵素の特異的なアミノ酸置換を発見し、部位特異的な変異タンパクを用いてその置換の意味を酵素活性および構造解析の両方の実験的手法により明らかにしたことは、高圧低温の深海環境への酵素の適応機構の分子生物学的解明に貢献するところが大きいものと評価される。

よって、本論文は、博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。なお、審査にあたっては、論文に関する専攻内審査および公聴会など所定の手続きを経たうえ、平成17年2月22日、農学研究科教授会において、論文の価値ならびに博士の学位を授与される学力が十分であると認められた。