深海微生物に期待！

秦田勇二，宮崎征行，大田ゆかり

海洋研究開発機構海洋・極限環境生物圏領域

はじめに

地球表面の7割は海洋が占め、さらに、海洋の平均深度は3,800 mであり、海洋は莫大な体積（生命保持領域）を抱えていると言える。地球上の炭素の分配を見ても海洋中に含まれる炭素比率は陸上と比較して17倍多いと計算される。生物は海洋から発生し進化を続け、多様性を創り上げてきた。したがって、海洋には数限りない種類の生体触媒が存在している。それらの生体触媒から、人々の生活を豊かにする生体触媒（酵素など）を探し出すことに大きな可能性と使命を感じる。深海は暗闇、低温（4℃前後）で高水圧の環境である。20世紀後半以降の潜水艇の開発に伴い深海の様子が少しずつ明らかになってきた（しかしいまだわからないことだらけの謎の世界である）。筆者らが所属する海洋研究開発機構では有人潜水調査船（図1）や深海探査機などを用いて深海の謎の解明に挑んでおり、深海調査成果の一つとして、深海領域は微生物に関しても多大な新規性と多様性に満ちていることがわかってきた。筆者らはバイオリソースとして大きな可能性を秘めている深海微生物を対象に新規有用酵素の探索を試みている。そのいくつかの取り組みを紹介させていただく。

深海底泥からのアガラーゼ生産菌のスクリーニング

日本人が古くから食材として利用している寒天は紅藻類に属する海藻（テングサ、オゴノリなど）から抽出される。その主成分はアガロースと呼ばれる多糖であり、D-ガラクトースと3,6-アンヒドロ-L-ガラクトースが α -1,3, β -1,4結合で交互につながった面白い構造をしている。アガロースを切断して得られるオリゴ糖には制がん効果や美白効果などの生理機能活性があることが報告されている。そこで筆者らはアガロースをオリゴ糖サイズに切断する酵素「アガラーゼ」を生産する微生物を、深海底

図1 ■ 有人潜水調査船「しんかい6500」

連載開始にあたって：海洋生物資源への期待：マリンバイオテクノロジーの現場から

海洋は、地球の表面積の約7割を占め、平均深度は3,800 mにも達する。そこには熱水噴出孔や寒冷な極地、高水圧の深海などさまざまな環境に適応した多種多様な能力をもった生物が存在する。生物がエネルギー代謝として酸素発生を伴う光合成を獲得したのは約27億年前であり、光合成する生物、藻類（シアノバクテリア）により大気中の酸素濃度が増加し、今の地球環境の礎ができあがった。このような多様な環境を有する海洋の生物資源は、古くから私たちの生活を食だけでなく医薬品を通じた健康という面からも支えてきた。近年では海洋藻類をバイオマスとしたエネルギー生産も期待されている。一方、有用物質を生産する微生物が必ずしも人工的な環境で培養できるとは限らず、分離、培養可能な微生物は1%にも満たないといわれている。海洋は有用微生物の宝庫であり、培養ができない微生物についても資源として利用できれば、新たな医薬品開発やエネルギー生産への道が広がると期待される。

本シリーズ「海洋生物資源への期待：マリンバイオテクノロジーの現場から」では、海洋利用研究のさまざまな取り組みについて海洋生物資源に焦点をあてながら5回にわたって紹介していただく。シリーズ第1回、秦田勇二先生ら（海洋研究開発機構）は、日本が世界をリードする深海研究における生物資源に関して解説していただき、第2回

目は田中 剛先生ら（東京農工大・工）によって、自然エネルギーとして現在産官学一体として取り組みが進められているバイオ燃料生産について、海洋微細藻類をバイオマス資源とした最新の研究について紹介していただく。第3回目は、家戸敬太郎先生ら（近畿大・水産）に、マグロ完全養殖を通じて、日本の最先端養殖技術について紹介していただく。第4回目は、高田健太郎先生ら（東京大院・農）に創薬研究に大きな貢献が期待されている海洋天然物の探索と応用について紹介していただく。最後に、竹山（早稲田大・生命医科）が、海洋の難培養微生物の有効活用をゲノム情報に基づいて進めるメタゲノム研究について報告し、本シリーズを完了する。

日本は国土を海洋に囲まれた海洋国家であり、排他的経済水域（exclusive economic zone; EEZ）は世界第6位の広さである。このような海洋をいかに有効利用するかは、今後の日本の発展に大きく影響するものである。2007年4月に海洋基本法が成立したが、海洋資源開発はその施策の重要項目である。多くの研究者が、精力的にこの分野で活躍しており、その一端を本シリーズで紹介することで、新たなネットワークができることを期待している。

（竹山春子，早稲田大学先進理工学部生命医科学科）

泥サンプルを対象に探索した。わずかな炭素源と人工海水を主成分とする寒天固体培地上に、深海底泥サンプルを人工海水で希釈した溶液を塗布して数日間保温した（4℃，15℃，37℃の各温度にて）結果，出現した数多くの微生物のコロニーに交じってまれにコロニー周囲に凹みを形成する微生物が見受けられた。それらの微生物のうちのいくつかを選択して16S rRNA遺伝子の配列解析を行った結果，*Agarivorans*属，*Microbulbifer*属，*Pseudoalteromonas*属，*Shewanella*属，*Thalassomonas*属細菌などγプロテオバクテリアに属する微生物を中心に予想以上に多くの微生物種のアガラーゼ生産菌が取得された。

アガラーゼ生産菌 A94株

深海底泥サンプル由来アガラーゼ生産菌のなかから本項ではA94株を紹介する（図2）。本微生物は駿河湾の深度2,406 mに位置する深海底泥サンプルより発見された。系統解析の結果，A94株は*Microbulbifer*属細菌の仲間であり，52℃という高温でも生育できるその特徴から*Microbulbifer thermotolerans*と命名した⁽¹⁾。本微生物

物のゲノムDNAを対象に，ショットガンクローニング法によりアガラーゼをコードする遺伝子を探索した結果，GH（Glycoside hydrolase）ファミリー16に属するβアガラーゼ（AgaA）遺伝子（ORF; 1299 bp）とGHファミリー86に属するβアガラーゼ（AgaO）遺伝子（ORF; 3528 bp）の2種の遺伝子が取得された。つづいて，枯草菌を宿主として各々の酵素遺伝子を発現させた後，各組換え酵素の諸性質を調べたところ，AgaAと

図2 ■ A94株の寒天固体培地上での生育の写真(左)と電顕写真(右)

図3 ■ A94株由来耐熱性アガラゼの温度安定性
(各温度で30分間処理後の残存アガラゼ活性)

AgaOの諸性質は大きく異なっていた。AgaAはアガロースを切断し主産物としてネオアガロオリゴ4糖を生成する⁽²⁾。一方、AgaOは主産物としてネオアガロオリゴ6糖を生成する⁽³⁾。AgaAは耐熱性を有する酵素であり、たとえば60℃において30分間保温した後もその活性を維持することができた(図3)。一方、AgaOは50℃において30分間保温すると大きな活性低下が見られた。金属塩に対する影響もこの両者の酵素では大きく異なった。AgaOは酵素の安定にカルシウムイオン(10 mM程度)あるいはマグネシウムイオン(100 mM程度)を強く要求する。あるいは1 M程度のNaClを添加すると安

定になる(興味深いことに海水に含まれる塩濃度に近い)。一方、AgaAはこれらの金属塩がなくても安定であった。EDTAなどのキレート剤に対する効果も両者で異なり、AgaAはキレート剤に耐性であった(安定化や活性発現に2価の金属イオンを必要としていないと言える)。AgaAはSDSなどの界面活性剤に対する耐性もあり、総体的にとっても安定性の高い酵素であると言える。2009年4月、AgaAは筆者らと試薬メーカーであるニッポンジーン(株)との共同開発により遺伝子解析用試薬「耐熱性アガラゼ」として製品化された。主にアガロースゲル電気泳動後のDNA断片の抽出に利用される試薬である(100 kbpを超える大きなサイズのDNA断片も効率良く回収できる)。アガロースゲルを融解状態で保つための温度は高温(50℃以上)である必要があるため効率の良いアガロース分解に耐熱性アガラゼが威力を発揮する。さらに電気泳動用のアガロースゲルは通常キレート剤であるEDTAを含有しており、本酵素はキレート剤にも耐性であることが長所として活かされている。

AgaAをコードする遺伝子とAgaOをコードする遺伝子はA94株の染色体上で約13 kbp離れて存在していることがPCR実験より明らかとなった。両酵素遺伝子の間には紅藻類多糖あるいは細胞壁成分を代謝するための遺伝子群がクラスターを形成していることが予想できたため、本13 kbp間とその前後の領域のDNA配列解析を

表1 ■ A94株染色体DNA上の*agaA*と*agaO*遺伝子近傍に存在するORFの解析

遺伝子名	遺伝子コード位置	転写方向	アミノ酸数	相同タンパク質のアノテーション	相同タンパク質保有株	相同領域オーバーラップ	相同性	アクセッション番号
<i>orf1</i>	1900-3741	+	613	Hypothetical protein (containing a conserved-domain for predicted phosphatase, PhoX)	<i>Rhodospirillum rubrum</i> ATCC11170	285/590	48	YP_428088
<i>agaO</i>	4306-7833	+	1175	Agarase (AgaO)	<i>Microbulbifer thermotolerans</i> JAMB-A94	1,175/1,175	100	BAD86832
<i>cgiA</i>	8847-10556	+	569	ι -Carrageenase	<i>Zobellia galactanivornas</i> Dsij DSM12802	185/569	29	CAC07822
<i>orf3</i>	14581-15552	+	323	2-Keto-3-deoxygluconate kinase	<i>Saccharophagus degradans</i> 2-40	143/316	45	YP_528128
<i>agaA</i>	21118-22419	+	433	Agarase (AgaA)	<i>Microbulbifer thermotolerans</i> JAMB-A94	433/433	100	BAD29947
<i>orf4</i>	1529-933	—	198	Lipase class 2	<i>Cyanothece</i> sp. PCC 8801	75/192	39	YP_002374003
<i>orf5</i>	14143-10634	—	1169	TonB-dependent receptor	<i>Saccharophagus degradans</i> 2-40	602/1,225	49	ABD81912
<i>orf6</i>	16411-15692	—	239	Peptide transport system permease protein (SapC)	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i> T6c	105/235	44	YP_662115
<i>orf7</i>	17982-16429	—	517	Tryptophan halogenase	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i> T6c	332/517	64	YP_662116
<i>orf8</i>	20876-18072	—	934	TonB-dependent receptor	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i> T6c	547/932	58	YP_662117

行った。その結果を表1に示す。2-ケト-3デオキシグルコン酸キナーゼなどいくつか興味深い遺伝子が見つかり、なかでもイオタカラギナーゼ遺伝子の発見は特に興味深いものであった⁽⁴⁾。カラギーナンはアガロースと同様に紅藻類に属する海藻（キリンサイなど）の細胞壁・細胞間に多く含まれる多糖であり、D-ガラクトースや3,6-アンヒドロ-D-ガラクトースが α -1,3, β -1,4 結合で交互につながった2糖を繰り返す単位とする直鎖状骨格を基本骨格とする。さらにこの骨格に硫酸基が付与され、硫酸化多糖として存在する。この硫酸基の付与形態の差で多様性が生じ、 ι （イオタ）タイプ、 κ （カッパ）タイプ、 λ （ラムダ）タイプに大別される多糖である。本 ι -カラギナーゼ遺伝子を枯草菌宿主発現ベクター系⁽⁵⁾ に導入して生産させた酵素の諸性質の解析を行った。その結果、本酵素はエンド形式で ι -カラギーナンを切断し、最終産物としては4糖オリゴ糖を主産物として生成する酵素であった。NaCl濃度が100 mM付近で活性が最大となる。反応過程での反応生成物の還元末端アノマー炭素の立体配置を調べると本分解反応はインバージョン形式で進行することが明らかとなった。本酵素は ι タイプのカラギーナンを切断するが、 κ タイプ、 λ タイプのカラギーナンには全く作用しない厳密な基質特異性が認められた。データベースを対象に既報告の酵素とアミノ酸配列の相同性を調べた結果、*Zobellia galactanivorans* Dsij DSM 12802 由来の ι -カラギナーゼと29%、*Alteromonas fortis* ATCC 43554由来の ι -カラギナーゼと31%の一致性を示した。さらに詳細にアミノ酸配列を比較したところ、Rebuffetら⁽⁶⁾ が提唱した触媒残基 Glu245と Asp247の間には1個のアミノ酸残基しか存在しないのに対し、A94株由来の ι -カラギナーゼには7個（Glu351-Asp359間）のアミノ酸残基が存在していた（図4）。通常、酵素全体の折り畳み構造が類似している場合、触媒を司るアミノ酸の立体配置は高く保存されて

いる。これを前提に、*A. fortis*由来の酵素の構造を基に触媒残基付近の立体構造を予想したが、*A. fortis*由来の酵素とA94株由来酵素の活性残基と推定される酸性アミノ酸残基が重なり合うことはなかった。そこで活性中心を形成することが予想される2つの酸性アミノ酸残基を一つずつアミド型に変異させた2つの点変異酵素を作成し、その活性や速度論定数を実際に測定した。その結果、変異を施した2つの酸性アミノ酸残基のうちのひとつ（Glu351）は、予想どおり酵素活性に必須であるという結果が得られたが、もう一方（Asp359）は必ずしも必須ではないという結果が得られた。 ι -カラギーナンの β -1,4 結合は、構成糖の一つである3,6-アンヒドロ-D-ガラクトースに存在する2-O-硫酸基による安定化を受けているため、比較的安定と考えられる。しかしいったん、 ι -カラギーナンポリマーが ι -カラギナーゼに結合した場合、2-O-硫酸基は基質ポケットの中にある塩基性アミノ酸（アルギニン）にしっかりと結合する。 ι -カラギーナンの β -1,4 結合に対する安定化作用が失われ、結合は不安定になる。本来安定なはずの構成糖間の結合が、酵素との相互作用によって弱められることによって、切断が容易になると推定することができる。活性アミノ酸残基が必ずしも2つそろわなくとも、基質の加水分解が起こり得るという非常に珍しい現象は、酵素が引き起こす基質の変化により説明できると考えている。

3種のカラギナーゼの取得とその応用展開

ヒト細胞の表面には、グリコサミノグリカンと呼ばれる硫酸化糖が存在しており、細菌やウイルスの認識など生命にとって重要な役割を果たしていることが知られている。カラギーナンは前項でも記述したとおり、硫酸化多糖であり、それらの構造はヒト細胞表面糖鎖とも類似性があり、新たな生理機能活性の発見が期待できる。し

図4 ■ ι -カラギナーゼ活性中心付近アミノ酸配列のアライメント

AltCgi: *Alteromonas fortis* ATCC 43554 由来の ι -カラギナーゼ。ZobCgi: *Zobellia galactanivorans* Dsij DSM 12802 由来の ι -カラギナーゼ。A94Cgi: *Microbulbifer thermotolerans* A94 由来の ι -カラギナーゼ。（矢印部分はRebuffetらが提唱した触媒残基、破線内は3種の酵素配列において高い保存性が認められた領域を示す。）

図5 ■ 3種カラギーナーゼを用いた食品・飲料品中のカラギーナン種別同定

食品・飲料品素材に対して ι 、 κ 、 λ -カラギーナーゼを各々作用させた後スタンダードを参照にHPLC分析（陰イオン交換カラム使用）を行う。図内の矢印は検体に κ -カラギーナーゼを作用させた際に得られたピークが κ -カラギーナンオリゴ糖と一致した結果を示す。

かしながら多糖のままでは分子が大きいためヒト細胞に対する機能評価が容易ではない。そこでカラギーナンをオリゴ糖サイズに切断する酵素を深海微生物から取得することとした。探索の結果 *Pseudoalteromonas* 属細菌から λ -カラギーナン切断酵素遺伝子の取得に成功した⁽⁷⁾。驚くことに本酵素はデータベースに登録されている既報告の酵素と全く相同性を示さなかった。新規酵素として国際生化学分子生物学連合に認められ、新たなEC番号（EC 3.2.1.162）が設定された。 κ -カラギーナン切断酵素も *Pseudoalteromonas* 属細菌より発見した。 κ 、 ι 、 λ -カラギーナン分解酵素の3種酵素を深海微生物より発見することがなされたので、現在、各カラギーナンをオリゴ糖サイズに消化し、ヒト細胞に対してその生理機能活性を調べている。3種カラギーナーゼのほかの応用研究として食品・飲料品に含まれるカラギーナンの種別同定を提案した。3種の酵素の基質特異性を調べたところ明確な基質特異性が確認できた。A94株由来 ι -カラギーナーゼの項でも記述したのと同様に、 λ -カラギーナーゼは λ タイプのカラギーナンをよく分解するが他タイプのカラギーナンには作用しない。 κ タイプに関しても全く同様であった。この厳密な基質特異性を利用することで混合物中に含まれるカラギーナンの種別を解析することが可能であった。そこで、これら3種の酵素を応用した、食品・飲料品素材に含まれるカラギーナンの簡易同定法（図5）を提案した⁽⁸⁾。

海底より検出されたリグニン代謝微生物

深海は光合成による一次生産が行われないため多くの場所では生物にとって栄養となる有機物が乏しい。一方、陸上や浅海域で増殖した植物や動物の死骸が沈降した場所では、沈降物を大量かつ持続的な栄養源として、多様で活動的な生態系が形成される。筆者らは深海に沈降した有機物を中心に形成される生態系に棲息する生物には、バイオマスをさまざまな物質やエネルギーに変換する優れた能力があると考えており、これらの生物機能を見だし、われわれの生活に活用するための取り組みを行っている。地球で生産されるバイオマスのうち最も存在量が多いのはセルロースであり、リグニンが2番目に続く。リグニンは芳香族化合物であるフェニルプロパノイドが不規則に結合した非常に複雑な構造をしており、極めて難分解性であるため、その利用技術開発は、現在も極めてチャレンジングな課題として残されている。近年、リグニンの構造や化学的性質から石油化学製品の代替として利用できる可能性が注目され始め、非常に精力的な研究が進んでおり、物理化学的、生物学的手法を用いたリグニン変換に関する分子基盤についてさまざまな知見が急速に集積しつつある^(9,10)。

地上での木材の生物による分解は木材腐朽菌と総称される真菌類の作用によって開始される。木材腐朽菌は酸化還元酵素や低分子化合物を生産し、これらを協調的に制御したさまざまな菌体外ラジカル反応により、高密度にパッキングされた高分子セルロースやリグニンを巧みに分解していく。腐朽菌による腐朽が進んだ木材は、通

図6 ■ 海底から取得された枕木とその内部から検出された穿孔性の貝(左)および穿孔する際に形成される細粒子フンの表面に検出された微生物の電顕写真(右)

常強い酸性を示すため、耐酸性バクテリアコミュニティが同時に形成されることも知られている⁽¹¹⁾。一方、海洋中では、多くの木材腐朽菌の増殖は阻害され、木材腐朽菌酵素の多くもまた、海水中で阻害されることが知られている。一般に海域に入ってきた木材の場合には、キタイ貝やフナクイムシと呼ばれる二枚貝による穿孔で分解が開始されることが多い(図6左写真)。木材を餌とする貝が穿孔する際には細かい粒子のフンが周辺に放出され、種々の微生物に生活の場や栄養を提供する(図6右写真)。貝を捕食するゴカイの仲間も集まり、活動的なコミュニティが形成される。生物密度が高まり、硫化水素の発生を伴う場合もしばしば観察される。このような特殊な生態系には、陸上とは別の木材成分分解機構が存在する可能性が期待できる。そこで筆者らは木材バイオマス成分の一つとして、まずリグニン代謝の下流に位置する芳香族化合物を代謝する微生物の探索を行った⁽¹²⁾。海水にオガクズを混ぜ作った培地を使って、深海沈木や海底堆積物などから約500株の微生物を単離し、これらの微生物の芳香族化合物に対する代謝活性を調べたところ、多くの微生物がクマル酸、フェルラ酸、バニリンなどの複数のリグニン関連芳香族化合物を代謝することがわかった。代謝株の16S rRNA 遺伝子に基づく分類学的位置を調べたところ、Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria などの多様な門に属していた。現在、これらの微生物の代謝様式や遺伝子の解析を進めている。これらの深海微生物から、リグニンあるいはリグニンから誘導される低分子化合物の生物変換に役立つ機能を特定し、プラスチックなど、身近な生活に必要な化成品に変換する技術へとつなげていきたい。

おわりに

深海には化学合成環境など一次生産が盛んな場所も散在するが、大半の深海領域に棲息する微生物は上層部か

ら沈んでくる限られた有機物に栄養源を依存している。ゆえに効率の良い特別なアイテム(生体触媒)を獲得(進化)し、したたかに暮らしている微生物も多いと推察される。筆者らは上記のほかにも α アガラゼ⁽¹³⁾、酸化剤耐性アミラーゼ⁽¹⁴⁾、糖転移酵素(難水溶性化学物質の可溶性を向上)⁽¹⁵⁾、トレハロース生成酵素、強力溶菌酵素などの有用酵素のほか、新規性のたいへん高い深海微生物のいくつかから抗菌活性物質の発見にも成功している。またこれらの報告はいずれかの機会に紹介させていただきたい。

文献

- 1) M. Miyazaki *et al.* : *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **58**, 1128 (2008).
- 2) Y. Ohta *et al.* : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 1073 (2004).
- 3) Y. Ohta *et al.* : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **66**, 266 (2004).
- 4) Y. Hatada *et al.* : *Mar. Biotechnol.*, **13**, 411 (2011).
- 5) Y. Hatada *et al.* : *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 9895 (2006).
- 6) E. Rebuffet *et al.* : *Biochemistry*, **49**, 7590 (2010).
- 7) Y. Ohta & Y. Hatada : *J. Biochem.*, **140**, 475 (2006).
- 8) 秦田勇二, 大田ゆかり : 財団法人アサヒビール学術振興財団研究紀要, **22**, 23 (2009).
- 9) 飯塚堯介監修 : “ウッドケミカルの新展開”, シーエムシー出版, 2007.
- 10) D. Floudas *et al.* : *Science*, **336**, 1715 (2012).
- 11) V. Valášková *et al.* : *ISME J.*, **3**, 1218 (2009).
- 12) Y. Ohta *et al.* : *OJMS*, **2**, 177 (2012).
- 13) Y. Ohta *et al.* : *Curr. Microbiol.*, **50**, 212 (2005).
- 14) Y. Hatada *et al.* : *Enz. Microbial. Tech.*, **39**, 1333 (2006).
- 15) V. S. Hung *et al.* : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **68**, 757 (2005).

プロフィール

秦田 勇二 (Yuji HATADA)

＜略歴＞現在，海洋研究開発機構・海洋極限環境生物圏領域・海洋生物多様性研究プログラム・海洋有用物質の探索と生産システムの開発研究チーム・チームリーダー，横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科客員教授（兼務）

宮崎 征行 (Masayuki MIYAZAKI) ＜略歴＞現在，海洋研究開発機構・海洋極限環境生物圏領域・深海地殻内生物圏研究プログラム・深海地殻内生命圏システム研究チーム・技術研究副主事

大田ゆかり (Yukari OHTA)

＜略歴＞現在，海洋研究開発機構・海洋極限環境生物圏領域・海洋生物多様性研究プログラム・海洋有用物質の探索と生産システムの開発研究チーム・主任研究員

竹山 春子 (Haruko TAKEYAMA)

＜略歴＞1992年東京農工大学工学研究科物質生物工学専攻博士後期課程修了，博士（工学）／マイアミ大学博士研究員／1994年より東京農工大学工学部生命工学科（助手，准教授，教授）／2007年より早稲田大学先進理工学部生命医科学科教授＜研究テーマと抱負＞環境生物遺伝子資源の解析と有効活用，それらを支える解析技術の開発．難培養微生物学の扉を開くことを目指しています
＜趣味＞庭いじり