極限環境微生物のエネルギー変換に関する生化学および熱力学的解析

神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科　若　井　　暁

はじめに

地球上には温度，塩濃度，pH，圧力など，かなり厳しい物理条件に曝される環境が存在し，そのような環境に生育する微生物は極限環境微生物と呼ばれる．どのような過酷な環境に細胞が置かれようとも，そこで生命が活動しているのであれば，生命の定義の一つであるエネルギー獲得は必ず行われている．生物のエネルギー獲得（変換）の限界を知ることは，生命の限界を知ることでもあるだろう．したがって，筆者は，極限環境生物がその種々の過酷な環境で行っているエネルギー獲得に興味を持ち研究を行ってきた．エネルギー変換の研究は，分子，細胞，および，生態系レベでの様々な現象が含まれるため単純ではないが，生化学的なアプローチに加えて，熱力学的な測定を導入することで，生命の本質としてのエネルギー変換を理解したいと考えている．本稿ではこれまで携わってきた各種極限環境微生物（高度好塩性菌，好酸性菌，好熱菌，好冷菌など）に関する研究と現在進めている難変換エネルギーを利用する微生物についての研究の概要を紹介する（図1）．

1.　高度好塩性菌のエネルギー変換に関する熱力学的解析

食塩濃度10％を超える環境で良好に生育する微生物は，高度好塩性菌と呼ばれている．高度好塩性菌，特にアーキアでは，細胞外の極度に高い塩濃度から生じる浸透圧を解消するために，細胞内にも著量の塩を蓄積している．これにより，細胞内外の酵素ほとんど全てが高塩環境に曝されることになり，酵素レベルで高塩環境に適応している．酵素レベルでの塩適応の研究は多く存在するが，生体のエネルギー変換の研究はほとんどない．高塩環境は水分活性を低下させ，溶液中の物質の水和状態に影響する．水和状態の低下は，生体内のエネルギー変換で使われるATPの自由エネルギーに影響する．そこで，高塩環境で高エネルギーリン酸化合物を加水分解した時の反応熱について，高度好塩性菌由来の酵素反応を等温滴定マイクロカロリメータ（ITC）により測定した．高エネルギーリン酸化合物の加水分解は，エンタルピー駆動で進行することが知られており，水和状態が小さくなる低水分活性状態で自由エネルギー変化とエンタルピー変化が小さくなるというのが物理学の常識となっていた．しかしながら，高度好塩性菌由来酵素反応は，水分活性が0.84程度まで減少する4 M NaCl存在下でも低塩濃度下での非好塩性菌由来酵素反応と同じ反応熱（エンタルピー変化）を示すことを明らかにした[1]（図2）．また，本菌の持つピロリン酸加水分解酵素は，細胞内の塩濃度に相当するMオーダーのNaClやKClでの高い活性に加えて，0 M NaCl下でも100–200 mMの$MgSO_4$存在下で高い活性を示し，細胞内に多く存在する一価と二価のカチオンを組み合わせて幅広い塩環境下で高い活性を発揮できることを明らかにした[2]．高マグネシウム環境下では，ピロリン酸加水分解に対するエンタルピー変化が減少することが実験的に確認されてきており，飽和食塩濃度で生育する高度好塩性菌が多く存在するのに対して，飽和マグネシウム濃度で生育する微生物が報告されないことはエネルギー獲得の面からも限界があるのかもしれない．

2.　好酸性菌のエネルギー変換に関する研究

次に，高塩環境から強酸性環境に視点を移す．酸性環境は，地球上の様々な環境に存在するが，特にバイオリーチング（鉱石から微生物の力を使って有用金属を回収する技術）における人工的な環境に注目した．バイオリーチングでは，硫黄鉱石に酸化鉄溶液を散布し，三価鉄の還元力によるイオンアタックとそこに生息する微生物による硫黄層分解と鉄イオン再酸化によって銅などの有用金属を回収する．このバイオリーチングのモデル微生物として，好酸性鉄・硫黄酸化細菌*Acidithiobacillus ferrooxidans*が知られているが，リーチング効率のキーとなる硫黄酸化については不明な点が多く残されていた．

筆者は，呼吸・電子伝達阻害剤を使用して，鉄酸化と硫黄酸化による呼吸の際に異なる電子伝達経路が使用されていることを

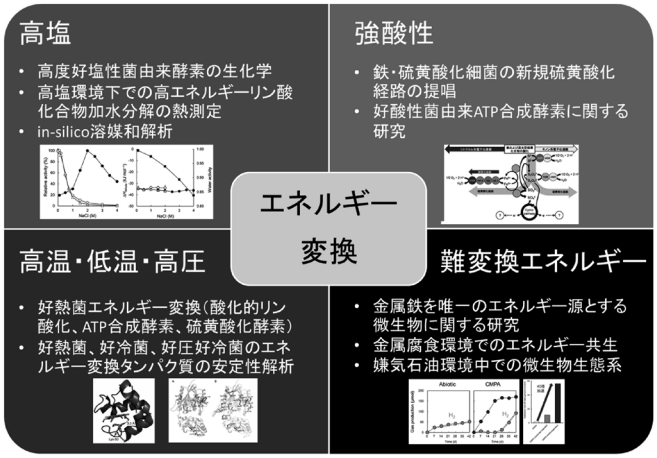

図1　エネルギー変換を中心においた各種極限環境微生物に関する研究の位置付け

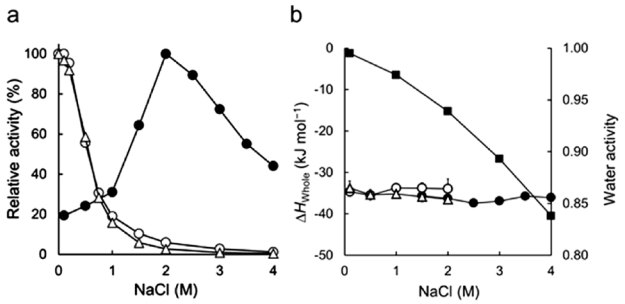

図2　高度好塩性菌および非好塩性菌のピロリン酸加水分解活性（a）および反応熱（b）に対するNaClの影響
●：高度好塩性菌，○：大腸菌，△：酵母，■：水分活性．

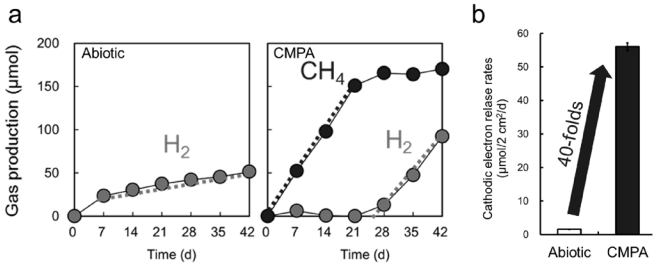

図3 鉄腐食性メタン生成菌（CMPA）による金属腐食時のガス発生量と電子流失速度
(a) 無菌区および CMPA 存在下での金属鉄からのガス生産量，(b) CMPA によるガス生産時の電子流失速度

明らかにし[3]，硫黄酸化経路のキー酵素として Sulfide:quinone oxidoreductase を精製，特徴づけ，鉄硫黄生育時よりも硫黄生育時において強く発現していることを明らかにした[4]．*A. ferrooxidans* では，鉄酸化による呼吸においてチトクロム系の電子伝達鎖が使用されていることが知られていたが，本研究により硫黄酸化による呼吸においてはキノン系の電子伝達鎖が使用されていることを明らかにした．

3. 好熱菌および好冷菌のエネルギー変換に関する研究

次に，環境中の物理パラメータを温度に移す．高温環境や低温環境では，エネルギー変換に関与するタンパク質分子が正しく機能する必要がある．筆者は，好熱性水素細菌の硫黄酸化酵素の熱安定性[5]や酸化的リン酸化経路における ATP 合成酵素の役割[6]などについて報告している．これらに加えて，エネルギー変換に重要な役割を演じている電子伝達に関与する電子キャリアタンパク質の安定性に関する多数の研究報告がある．好冷菌，中温菌，好熱菌由来相同タンパク質間には属レベルを越えて，生育至適温度と熱安定性の間に正の相関があるが[7–9]，深海微生物由来タンパク質では，この相関から少し外れて高い安定性が見られる[10,11]．これは，深海が低温であるため分子にフレキシビリティが必要である一方で，高い静水圧による変性を防ぐために高い熱安定性が必要なためである．さらに，好冷菌と中温菌由来酵素の比較研究では，好塩性菌由来酵素の知見から塩環境の違いにも注目し，*Shewanella* 属細菌を生育の塩嗜好から，0 M NaCl でも生育できる耐塩性と 0 M NaCl では生育できない好塩性の株に分け，ヌクレオチダーゼの塩依存性活性や構造に由来する耐塩性をも明らかにしている[12]．

4. 難変換エネルギーを利用する微生物

最後に，珍しいエネルギー獲得系として，通常の微生物がエネルギー源として利用できない固体金属をエネルギー源として使用する微生物についての研究がある．固体金属から電子を抜き取ると金属イオンが遊離するため，実環境では金属が腐食するという現象に繋がる．金属が微生物によって腐食する問題は，ヒトが微生物に感染して発症する微生物感染症とよく似ており，金属が罹る微生物感染症として独自のアプローチで研究を展開している[13]．この金属腐食に関与する微生物は長い間謎に包まれてきたが，筆者は近年多くの金属腐食性微生物を分離すると共に，鉄腐食性メタン生成菌が無菌区よりも 40 倍速く電子流失を加速する現象も捉えている（図3）．さらに，金属鉄を腐食する際に水素生産が可能であり，金属廃棄物から燃料用水素を生産する可能性についても開発を進めている[14]．

おわりに

エネルギー獲得（変換）は生命の根幹をなす重要な能力の一つであるが，その限界や本質も未解明な部分が残されている．今後も新しい切り口を取り入れながら，少しずつでも明らかにしていきたいと考えている．ところで，筆者の研究は多岐に渡りひどく拡散しているようにも見えるかも知れないが，現在これらの研究に加えて糸状菌を用いた物質生産に関する研究も進めており，これまでの蓄積を余すところなくつぎ込んで進めているつもりである．サイエンスはどこかで繋がっており，繋げるも分断するも担い手次第であると考えている．これまでの蓄積とこれから出会う新しい研究をつなぎ合わせながら，独自の視点を持った研究を進めていくことで，本奨励賞にふさわしい研究を進めていきたいと思う．

（引用文献）

1）Wakai S *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 288: 29247–29251, 2013
2）Wakai S *et al.*, *Extremophiles*, 21: 471–477, 2017
3）Wakai S *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68: 2519–2528, 2004
4）Wakai S *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71: 2735–2742, 2007
5）Sano R *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74: 892–894, 2010
6）Wakai S *et al.*, *Environ. Microbiol. Rep.*, 5: 235–242, 2013
7）Takenaka S *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74: 1079–1083, 2010
8）Fujii S *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77: 1677–1681, 2013
9）Fujii S *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 78: 1191–1194, 2014
10）Masanari M *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 80: 2365–2370, 2016
11）Masanari M *et al.*, *Extremophiles*, 18: 617–627, 2014
12）Kuribayashi T *et al.*, *Extremophiles*, 21: 357–368, 2017
13）若井暁．化学と生物，53(8): 515–520, 2015
14）若井暁，森浩二．化学，71(9): 29–33, 2016

謝　辞　本研究は，広島大学大学院生物圏科学研究科微生物機能学研究室，岡山大学農学部微生物機能開発学研究室，製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部で行われたものです．様々な極限環境微生物を扱う機会と熱力学的解析を始める機会を頂き，また終始ご指導頂きました三本木至宏先生（広島大学教授）に深く感謝を申し上げます．学生時代に極限環境微生物の研究テーマを与えて頂き，勝手気ままな私に懇切丁寧なご指導を賜りました上村一雄先生（岡山大学教授）に深く感謝を申し上げます．また，原山重明先生（現中央大学教授）にはポスドク時代にかなり自由な環境で研究を進めさせて頂き深く感謝を申し上げます．現在，雇用元のプロジェクトに加えて自由に研究できる環境を与えて頂いております近藤昭彦先生（神戸大学教授）ならびに荻野千秋先生（神戸大学教授）に深く感謝を申し上げます．また，カロリメータを用いた熱力学的解析についてご指導いただきました城所俊一先生（長岡技術科学大学）に深く感謝を申し上げます．仲宗根薫先生（近畿大学教授），鈴木誠先生（東北大学教授），金尾忠芳先生（岡山大学准教授），伊藤公夫博士（新日鐵住金），巴保義博士（JOGMEC）には，研究に関する様々なご助言や研究サンプルのご提供を頂き感謝申し上げます．全てのお名前を挙げることはできませんが，同じ場所で同じ時間を過ごした全ての学生やスタッフの皆様ならびに共同研究者の皆様に感謝申し上げます．最後になりましたが，本奨励賞にご推薦下さいました日本農芸化学会関西支部長河田照雄先生ならびにご支援を賜りました関西支部の先生方に厚く御礼を申し上げます．