ISSN 1348-5474

Dec. 2012

極限環境生物学会誌

第11巻 第2号

Journal of Japanese Society for Extremophiles

目次

巻頭言 …… 46
研究最前線 …… 47
ORIGINAL PAPER …… 49
MINI REVIEW …… 64
学会記事 …… 105
学会誌投稿規定・執筆要領 …… 108
会則・細則 …… 110
運営体制 …… 112

巻頭言

評価について

財団法人バイオインダストリー協会
小林良則

1947 年生まれの団塊世代です。2008 年 6 月までダイセル化学工業（株）で医薬関連事業の研究テーマ企画から基礎研究、工業化研究までを担当しておりました。同年 10 月以来、NEDO プロジェクト「（先導技術開発）／酵素糖化・発酵に資する基盤研究」の研究に従事して来ました。このような学会の皆さん方にはあまり相応しくない話題かもしれませんが研究開発における「評価」について少し述べてみたいと思います。

我々のプロジェクトの目標は我が国独自の高機能バイオマス糖化酵素（セルラーゼ）の創成、高効率糖化法及び高効率発酵法の開発を目指そうとするものです。最初に取り組んだテーマは、各種セルラーゼの活性評価法の標準化でした。これは文献上のデータだけでは活性測定（評価）方法がばらばらで、本当にどの酵素が優秀か読み取れないことに鑑み、各種酵素活性測定について標準化法を定め、これらにより各種市販酵素や自らの開発酵素の能力を同じ物差しで評価しようとするものです。この中で FPU 活性、CMC 分解活性やバイオマス糖化能等の活性測定法を標準化しました。また、この研究を進める上で、基質の標準化が重要と考え、草本系 2 種（稲わら、エリアンサス）、木本系 2 種（ユーカリ、杉）を取り上げ、苛性ソーダ・希硫酸・水熱処理法により作成した代表的特性の前処理物を標準前処理標品として定めました。そして、標準活性測定法と標準前処理標品を用い、各種市販セルラーゼと我々が創成した改良酵素の性能を比較評価しました。この結果、最終的に海外酵素メーカー製品の糖化性能を凌駕する高機能酵素の創成に成功しました。自分の立ち位置を冷静に、正確に、公平に評価できるかどうかはテクノロジーにおいて成功できるか否かのキーポイントです。

次に評価という面からみたサイエンスとテクノロジーについて。研究者の中には、往々にして安易にサイエンスとテクノロジ―を繋げて言う人がいます。サイエンスでは独りよがりでも良いのですが、テクノロジーではそうはいきません。テクノロジーとはあくまで他者との比較評価において、自分の見つけた、開発した、手法や物に何らかのアドバンテージがある場合にのみ言える言葉です。テクノロジーの客観的評価手段としての特許においては、新規性と進歩性がアンド条件でなければならないことからも分かります。

我が国は 1000 兆円にも達しようとする超借金大国です。いまや国民全体でどうしたら無駄遣いを止められるか真剣に考えるべきです。あちこちの研究機関で同じような研究が行われ、なかなか具体的成果に結びつかない現実に危惧を覚えます。なぜこのような状況が生まれているかという理由の一つが研究成果の評価にあると考えます。もう少し、成果を客観的に、公平に正確に評価して、効率的な研究資金の使い方を考えるべきです。その為に一番重要なことはそれだけの評価能力を有する人の存在だと思います。というより、本当のところは、評価の局面で、思ったことをはっきり言う人の存在だと思います。研究者の集まりは単なる情報交換の場ではなく、お互いの研究テーマの意義、研究成果について率直に評価、批判しうる場でなくては進歩は無いと思います。以前は学会などで、企業人が大学からの研究発表についてかなり辛辣な質問をする場面もあったように思うのですが、最近はあまり見受けません。大学は次世代の人材養成というミッションがありますので別に考えるとして、国民の税金で研究を行っている研究者は自分の研究テーマの意義、研究成果がどのような形で産業に活かせるかを常に念頭におきながら仕事をするべきです。無論、私自身も費用対効果の観点からやるに値する研究であるか自戒しながら進めているつもりです。

私は長年民間企業で経営の現実を目の当たりにして来ましたし、自らも新事業創成の難しさを体験してきました。企業経営における評価の実例で言えば、その厳しさを実感したのは、設備投資案件についての経営陣の可否評価と組織メンバーの業績評価です。いずれも企業存立を左右しかねない重要な評価でした。評価が甘いと、企業は倒産の危機を迎えますし、国家でさえも、莫大な借金で国民の将来を危ういものにします。正確で公平な物差しの存在と、使いこなせる人材が重要です。

我ら団塊の世代が碌な統治能力を持ち合わせていないことを露呈したここ数年でした。残間里江子さんが、団塊の世代よ、ソバ打ちに興じている場合かと挑発しています。我々の世代は少なくとも 70 歳位までは若者達の邪魔にならないように十分留意しつつ、日本の産業を立て直す為に自分達に何ができるかを考え、行動すべきと考えます。私の友人に中小企業やベンチャーで事業確立の為に奮闘している 40 代が何人かいます。また、数人の若者達がバイオ分野での新事業確立に向けて頑張っている姿も見ています。チャレンジする人がいなくなったら終わりです。このような人達にどんな手助けができるかを考え実行する事も我々世代の重要な課題だと思います。最後は脱線しました。

以上

研究最前線

独立行政法人農業生物資源研究所　乾燥耐性研究グループ　黄川田隆洋

「カラカラに干からびても死なない生物がいる。」ネムリユスリカの継代飼育法を確立させたばかりの奥田隆博士からこの話を始めて聞いたのは、2000 年の秋でした。ただの石粒のようにみえる乾燥した幼虫が、水に浸しただけで見る見るうちに吸水し息を吹き返していく様に、あっという間に魅了されたのはいうまでもありません。その瞬間、研究人生の全て賭けても値する研究対象であることを実感しました。カイコを用いたそれまでの研究をスッパリとやめ、ネムリユスリカの乾燥耐性機構の研究に没頭することになりました。主要メンバーとして奥田博士、渡邉匡彦氏、そして私が、各専門分野に分かれて研究をスタートさせました。

最初に着手した研究は、乾燥時特異的に蓄積する主要代謝産物の同定でした。渡邉氏と私は協力して、糖、脂質、アミノ酸の蓄積変動を調べていきました。その結果、（半ば予想通りでしたが）生体成分保護機能を持つことで知られている非還元性二糖のトレハロースが大量に蓄積している事を見いだしました。渡邉氏は昆虫生理学のエキスパートであったため、体長 7 mm 弱の小さな幼虫から自在に組織を取り出

すことができました。その卓越した技術を用い、断頭した幼虫であっても、摘出した脂肪体（哺乳動物の肝臓に相当する器官）であっても、乾燥刺激でトレハロースを蓄積して無代謝休眠（アンヒドロビオシス、乾眠とも呼ばれる）の状態になることを発見しました。このことから、ネムリユスリカは、神経系や内分泌系の関与無しに、各組織・細胞が自発的に乾燥無代謝休眠を誘導可能であることが示唆されました。

その後、奥田博士と渡邉氏は、ネムリユスリカの放射線耐性の生理学的研究を進展させ、乾燥幼虫は10k Gy もの高い放射線（γ線やヘリウムイオンビーム）を浴びても、吸水蘇生し、その後の生育が可能であることを示しました。一方、私は、専門分野である分子生物学・生化学の観点から無代謝休眠のメカニズムを理解することに努めました。次世代シーケンサーが隆盛を誇る現在では考えられませんが、多額の費用と 3 年もの時間をかけてサンガー型DNA シーケンサーを用いた EST データベースの構築をしました。その過程で、多細胞生物から初めてトレハロースストランスポーターTRET1 を発見し、アクアポリン（水チャネル）がネムリユスリカ体内からの水分蒸発を促進させることを見いだし、植物にしか存在しないと思われていた乾燥耐性関連因子である LEA タンパク質を昆虫から初めて同定しました。遺伝子を同定しても、機能を確認しなければ本当に乾燥無代謝休眠に重要なのかどうか分かりません。トランスポーターやチャネルなどの膜タンパク質の機能解析の場面で、アフリカツメガエル卵母細胞発現系は強力なツールになります。この実験を当時岩手大学大学院生だった斉藤彩子さんが行ってくれました。トレハロース溶液に浸した TRET1 発現卵母細胞の粗抽出液を用いて糖分析を行ったとき、HPLC のクロマトチャートにトレハロースのピークを確認し、狂喜乱舞したことを今でも鮮明に覚えています。現在でも卵母細胞発現系は、我々のラボでの遺伝子機能解析の基幹技術として継承されています。

時は経ち、現在では研究室のメンバーも増え、2007 年にネムリユスリカの逆遺伝学的解析（RNAi や遺伝子導入ユスリカの構築）を行っているフランス人研究員の Richard Cornette 博士が加わり、2011 年には組織化学のスペシャリストである志村幸子博士が加わりました。また、ポスドク研究員も様々な方々が在籍してきましたが、現在はネムリユスリカのゲノムやメタボロミクス解析を行っているロシア人研究員の Oleg Gusev 博士、新規トレハロースストランスポーターの同定とトレハロースの in vivo イメージングを研究している JSPS-PD の菊田真吾博士、そして LEA タンパク質の機能解析を進めている JSPS-PD の畑中理恵博士と一緒に研究を進めています。

国際色豊かなメンバーと共に、ネムリユスリカという奇妙な昆虫の全てを知るために、オーミクス解析から遺伝子機能解析、培養細胞の樹立、光学顕微鏡や電子顕微鏡を用いた細胞・組織化学的解析、果てはネムリユスリカの乾燥耐性機能を応用した生体成分の常温乾燥保存法の構築も行っています。ネムリユスリカ研究は、世界を見回しても我々の研究室でしか行っていません。オリジナリティーの代償として、全ての研究開発を自らが行わなければいけません。頼るものが他にいないことは大変ですが、だからこそ、私は全ても賭けても研究するに値すると思っています。独法の研究所と言うこともあり、学生さんが所属することは滅多にありませんが、農業生物資源研究所は東大大学院の連携講座を持っていますので、ネムリユスリカの研究に興味を持たれた学生会員の方々が、我々の研究に参加させることを強く望んでいます。また、実物のネムリユスリカをみたいと希望されればいつでも歓迎しますので、研究室を見学に来てください。

ORIGINAL PAPER

Journal of Japanese Society for Extremophiles (2012) Vol.11, 49-58

Zhang X[a], Nakahara T[a], Ochiai N[b], Kawauchi A[c], Hashimoto J[c], Inoue T[c] and Kudo T[c]

Diversity and function of aerobic culturable bacteria in the intestine of deep-sea holothurian

[a]Graduate School of Science and Technology, Nagasaki University, 1-14 Bunkyo-cho, Nagasaki 852-8521, Japan
[b]Faculties of Fisheries, Nagasaki University, 1-14 Bunkyo-cho, Nagasaki 852-8521, Japan
[c]Graduate School of Fisheries Science and Environmental Studies, Nagasaki University, 1-14 Bunkyo-cho, Nagasaki 852-8521, Japan

Corresponding author: Toshiaki KUDO, kudot@nagasaki-u.ac.jp
Phone & Fax: +81-95-819-2838

Received: August 17, 2012 / Accepted: October 4, 2012

Abstract Ninety-two aerobic culturable bacterial strains were isolated from each part of the intestine of the deep-sea holothurian collected at 32°30′N, 129°09′E (southeast of Fukue Island, Nagasaki, Japan) and water depth of 236 m in November 2010. The temperature of seawater at the water depth of the sampling point was estimated to be ca.13-14 °C from data in Japan Meteorological Agency. By partial 16S rRNA gene sequences of the isolates, the isolates belonged to 45 nearest type strain species (below, referred to as species). High diversity was observed in the genera *Bacillus* (21 species) and *Vibrio* (6 species). The bacterial diversity was similar among three parts, i.e. anterior, mid and posterior parts of the intestine and 14 species were detected in multiple parts of the intestine. Most isolates showed various polysaccharide degradation activities but few isolates showed alginate or agar degradation activities probably because there were no seaweeds containing alginate or agar in this deep-sea. Comparing the functions and properties of several species in three parts, the posterior part was likely to be different from the anterior or mid parts.

Key words: aerobic culturable bacteria; deep-sea holothurian; diversity; function; 16S rRNA gene

Introduction

Deep-sea is one of unexplored regions even today. Holothurians (~1430 species) are found on various sea floors from deep sea floors to intertidal areas [4,9]. Holothurians belong to phylum Echinodermata and their diet is detritus such as organic matter, microalgae, and bacteria[6,7,11].

Gut bacteria play an important role in digestion of diets. Studies on bacteria associated with Holothurians were reported only for *Holothuria atra*[10] and *Molpadia musculus*[1,2]. Ward-Rainey et al. reported partial aerobic bacterial flora of *Holothuria atra*. [10] In their report, only 23 isolates were characterized by 16S rRNA gene sequences analysis (the first 300 nucleotides) and they were affiliated to the genera *Vibrio* and *Bacillus*. On the other hands, Amaro et al. used non-culturing methods to analyze bacterial community of abyssal holothurian, *Molpadia musculus*.[2] Their results suggested that the gut bacterial composition was similar to that of the organic matter-rich sediments. Members of Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides (CFB) group dominated in the bacterial community[2]. Recently, they also found that ca. 82% of total bacterial OTUs (Operational Taxonomic Unit) were common between the gut contents and the surrounding sediments[1]. Enomoto et al. also reported recently that γ-*Proteobacteria* members were mainly isolated as culturable bacteria from the intestine of *Apostichopus japonicus*[3]. Using the molecular techniques, they also found that *Proteobacteria* members were main metabolically active microbial populations in the intestine of *Apostichopus japonicus*.

Gut microorganisms play an important role in digestion of diets, but the diversity and function of aerobic culturable bacteria in the intestine of the deep-sea holothurian are still unclear.

In this report, we isolated ninety-two aerobic culturable bacterial strains from each part of the intestine of the deep-sea holothurian collected at the southeast of Fukue

Island, Nagasaki, Japan, water depth of 236 m and in November 2010. We found that the aerobic culturable isolates belonged to 45 nearest type strain species (below, referred to as species). The bacterial diversity was similar among three parts, i.e. anterior, mid and posterior parts of the intestine. Most isolates showed various polysaccharide degradation activities but few isolates showed alginate or agar degradation activities probably because there were no seaweeds in deep-sea. On the other hand, when we compared the functions and properties of several species in three parts, the posterior part was likely to be different from the anterior or mid parts. Maybe the posterior part was related to the digestion of polysaccharides or high salt environment.

Materials and Methods

Sample collection and dissection

Deep-sea holothurian specimen was collected at southeast of Fukue Island, Nagasaki, Japan (32°30′N, 129°09′E), at a water depth of 236 m in November 21, 2010 (Fig.1). The temperature of seawater at the water depth of the sampling point was estimated to be ca.13-14 °C from data in Japan Meteorological Agency. The specimen was kept in icebox and aseptically dissected in our laboratory in November 24, 2010. Whole intestine was excised from the animal body aseptically using sterilized instruments. Fraction of intestine was carried out according to Shimizu et al. [8] The intact intestine was divided into three parts, the anterior part (0.71g), the mid part (0.88g) and the posterior part (1.80g) (Fig. 2). To isolate bacteria from both intestinal wall and contents, 1 ml of saline was added to each part and each part was crushed and mixed enough. Each suspension thus obtained was used for isolation of bacteria and 50 μl of the each suspension was spread on plates.

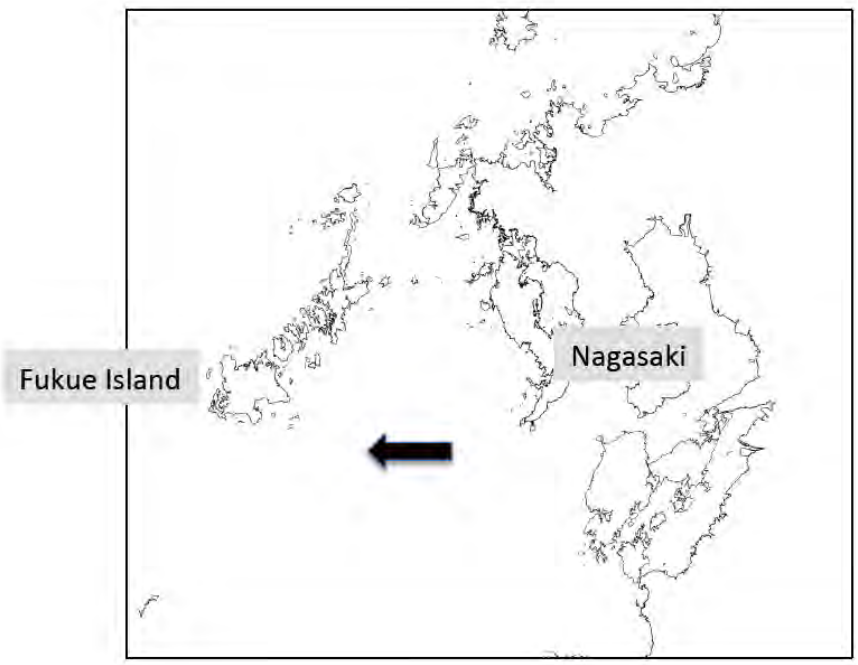

Fig.1 Map of sampling site (arrow) and environmental conditions.
Sampling point : 32°30′N, 129°09′E (Southeast of Fukue Island, Nagasaki, Japan) Water depth: 236 m, Sampling data: November 21, 2010, Temperature of water depth 200 m : ca.13-14℃, Sea surface temperature: ca. 21-22℃（Data from Japan Meteorological Agency）

Growth media

Luria-Bertani medium (LB) and Horikoshi medium were used basically. But NaCl concentration was 3.5% instead of 1%. Polysaccharides such as carboxymethyl cellulose sodium salt (CMC) (Wako pure chemicals, Osaka, Japan), xylan (Sigma), sodium alginate (Wako pure chemicals, Osaka, Japan) and soluble starch (nacalai tesque, Kyoto, Japan) were added to Horikoshi medium as carbon sources (final concentration 1%).

LB solid medium (pH 7) contained 1% tryptone (Difco), 0.5% yeast extract (Difco), 3.5% NaCl, and 1.5 % agar (Wako pure chemicals, Osaka, Japan). Horikoshi solid medium (pH 7) contained 1% polysaccharide, 0.5% peptone (BD), 0.5% yeast extract, 0.1% KH_2PO_4, 0.02%

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 3.5% NaCl, and 2% agar. Sodium alginate solid medium contained 2.5% agar. For 10% NaCl media, NaCl concentration of growth media was 10% instead of 3.5%.

For alkaline agar plates, Na_2CO_3 (autoclaved separately) was added to neutral agar medium (final pH: pH10.3-10.5). Na_2CO_3 concentration of alkaline plate was 1%.

Isolation of bacteria

Fifty 1 of the gut suspensions was directly plated on agar plates without enrichment culture. High salt concentration or high pH were used for isolation conditions to isolate various bacteria because marine water is semi-alkaline pH and contains 3.5% NaCl. Seventeen different media were prepared by combination of pH, NaCl concentration and carbon source (Table 1). The plates were incubated at 30 °C aerobically for two weeks to obtain slowly growing bacteria. Bacteria were isolated from each plate, purified and stored in slants for further analysis.

Table1 Number of the isolates obtained by differrent culture conditions

pH	Medium	Salinity	part of the intestine			subtotal
			anterior	mid	posterior	
pH 7	LB	3.5%	–	6	–	
	CMC	3.5%	1	3	–	
		10%	2	2	4	
	S	3.5%	2	3	1	
		10%	–	1	3	
	AL	3.5%	1	1	1	
		10%	4	2	7	
	XL	3.5%	2	3	1	
		10%	3	3	2	
subtotal			15	24	19	58
pH 10	CMC	3.5%	1	5	2	
		10%	–	–	2	
	S	3.5%	3	2	5	
		10%	–	–	–	
	AL	3.5%	2	–	1	
		10%	1	–	–	
	XL	3.5%	1	2	4	
		10%	1	–	2	
subtotal			9	9	16	34
Total			24	33	35	92

Physiological and biochemical characteristics of isolates

Polysaccharide degradation activities were detected by plate methods using CMC, xylan, alginate, starch or agar as substrate. The following plates were prepared for detection of enzyme activities.

1. Neutral agar plates

1-1. Amylase detection: Horikoshi agar medium containing 1% potato starch instead of soluble starch was used for amylase detection. Amylase-producing colony showed turbid halo around a colony.

1-2. Cellulase detection: Basic neutral agar medium for cellulase detection contained 0.1% CMC, 3.7% marine broth, 0.6% $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 1.5% agar, 1.6% NaCl, 0.0015% congo-red, adjust pH to 7.0 with 1N NaOH. Clear zone around a colony suggested cellulase activity.

1-3. Alginate lyase detection: The basic neutral agar medium for alginate lyase detection, contained 1% sodium alginate, 3% NaCl, 0.07% KCl, 0.26% $MgSO_4$, 0.5% $MgCl_2$, 0.1% $CaSO_4$, 0.5% peptone, 0.01% ferric phosphate, 0.1% yeast extract, 2% agar; adjust the pH to 7.0 with 1N NaOH. After two weeks' incubation at 30 °C, 70% ethanol was filled into plates. A clear zone around the colony indicated the presence of alginate lyase.

1-4. Xylanase detection: Horikoshi agar medium containing 1% xylan was used for xylanase detection. Xylanase-producing colony showed clear zone around a colony.

1-5. Agarase detection: Horikoshi agar medium without polysaccharide was used for agarase detection. Agarase-producing colony showed dent around a colony.

2. Alkaline agar plates

For alkaline agar plates, Na_2CO_3 (autoclaved separately) was added to neutral agar medium (final pH: pH10.3-10.5). Na_2CO_3 concentration of alkaline plate was 1%.

All isolates were tested for salt tolerance: 0%, 3.5%, 10%, 15%, 20%, 25% NaCl (w/v), pH tolerance (pH7 and pH10) and effect of oxygen.

Anaerobic growth was examined using gaspak (COSMO BIO) at 30 °C for two weeks, and then growth condition was changed to the aerobic condition at 30°C for two weeks. The isolates were assigned to three groups, facultative anaerobic bacteria (FA), anaerobic tolerant bacteria (AT) and aerobic bacteria (A). Facultative anaerobic bacteria form colony in both aerobic and anaerobic cultivation. Anaerobic tolerant bacteria do not form colony in anaerobic condition for two weeks but form colony in aerobic cultivation after the anaerobic cultivation. Aerobic bacteria do not form colony in anaerobic condition for two weeks and also do not form colony in aerobic cultivation after the anaerobic cultivation. Growth ability at various conditions of salinity or pH was measured at 30 °C for two weeks. The isolates were divided into two groups by effect of pH on growth, neutrophilic bacteria (NE) that grew only at pH7, and alkaliphilic/alkali-tolerant bacteria (ALK) that grew both at pH 7 and pH10.

Molecular identification of the isolates

Partial analysis of 16S ribosomal RNA (rRNA) gene of the isolates was carried out. The 16S rRNA gene was amplified using bacterial primers 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1492r (5'-GGTTACCTT GTTACGACTT-3') and the purified PCR product was sequenced with dideoxynucleotide chain-termination method using 3130 or 3730 DNA sequencer (Applied Biosystems). Primers 27F, 520R (5'-ACCGCGGCT GCTGGC-3') and 907R (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3') were used in gene sequencing reactions. Sequences of the partial 16S rRNA genes were assembled and edited using Sequencher (version 4.10.1 demo, Gene Codes Corporation) and MacVector (version 10.0.2). Nucleotide sequences of the partial 16S rRNA genes have been submitted to GenBank/EMBL/DDBJ databases under accession numbers AB741781 through AB741873 except AB741857 (Supplementary Table 1).

The partial 16S rRNA gene sequences were compared with other sequences in DDBJ database using BLAST program and compared with type strain sequences in Ribosomal database project (RDP). Each isolate was assigned to nearest type strain species (Supplementary Table 1). When isolate showed more than 97% identities with some type strain sequences, the isolate was assigned to nearest type strain species (below, referred to as species). When isolate showed less than 97% identities with any type strain sequences, the isolate was assigned to the tentative nearest type strain species (below, referred to as tentative species).

Results

Isolation of bacteria

Fig.2 shows photographs of the deep-sea holothurian and its dissection (C), including anterior intestine (1), mid intestine (2), posterior intestine (3), Polian vesicle (4) and respiratory trees (5). But Cuvierian tubules were not detected in the specimen. The each intestine suspension was directly plated on agar plates and seventeen isolation media were used. Table 1 summarized number of the isolates obtained by different cultural conditions. The intact intestine was divided into three parts, the anterior part, the mid part and the posterior part. The each part was crushed and mixed enough and the suspensions thus obtained were used for isolation of bacteria. Number of colony forming units (cfu) per g of the anterior, mid and posterior parts were 1.4×10^4 cfu/g, 0.6×10^4 cfu/g and 0.58×10^4 cfu/g in LB medium, respectively. Similar cfu numbers were obtained in Horikoshi media (pH7), but lower cfu numbers in the alkaline Horikoshi media (ca. pH10.3).

Twenty-four, 33 and 35 isolates were obtained from the anterior, mid and posterior suspensions, respectively. In total, 92 isolates were purified and analyzed further.

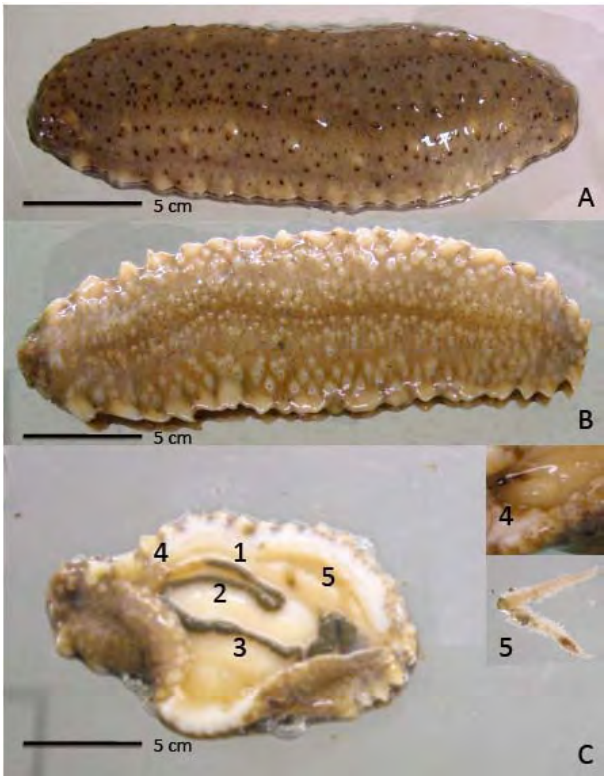

Fig. 2 Photographs of the deep-sea holothurian (dorsal side A, ventral side B) and its dissection (C), including anterior intestine (1), mid intestine (2), posterior intestine (3), Polian vesicle (4) and respiratory trees (5). Cuvierian tubules were not detected in the sample.

Phylogenic analysis of bacterial isolates

The partial 16S rRNA gene sequences were done and compared with other sequences in DDBJ database using BLAST program and compared with the type strain sequences in Ribosomal database project (RDP). Table 2 summarized the species/the tentative species of the isolates as determined via BLAST (Supplementary Table 1). By partial 16S rRNA gene sequences of the isolates, the isolates belonged to 45 species. Fourteen species were detected in multiple locations of three parts, i.e. anterior, mid and posterior parts of the intestine. The isolates belonged to the phyla Firmicutes (33 species) and Proteobacteria (12 species) (Table 2). Among 33 species of the phylum Firmicutes, 21 species belonged to the family Bacillaceae 1, the genus *Bacillus*. Ten species belonged to the family Bacillaceae 2, the genera *Gracilibacillus*, *Halobacillus*, *Oceanobacillus*, *Thalassobacillus* and *Virgibacillus*. Twelve species of the

phylum Proteobacteria belonged to the genera *Vibrio*, *Halomonas, Photobacterium, Pseudomonas* and *Marinobacter*. Among them, high diversity was found in the genera *Bacillus* and *Vibrio*. The closest relatives of these isolates were observed in various sea environments. The bacterial diversity was similar among three parts, i.e. anterior, mid and posterior parts of the intestine (Fig.3) and 14 species (indicated by star in Table 2) were detected in multiple parts of the intestine. But, the number of species belonged to the family Bacillaceae 2 decreased in the posterior part of the intestine compared with those in the anterior or mid parts of the intestine (Fig.3).

Three isolates (isolate no. C214, C254 and C271) showed less than 97% identities with any type strain sequences. The isolates were assigned to the tentative species. (Supplementary Table 1).

Table2 Phylogenetic affiliation for isolates (92 strains) from various parts of the intestine

phylum/class/family	genus	species /tentative species	part of the intestine		
			anterior	mid	posterior
phylum Firmicutes					
family Bacillaceae 1	*Bacillus* (21)	*Bacillus aerophilus*			+
		Bacillus aerophilus/Bacillus altitudinis	+		
		Bacillus altitudinis/Bacillus stratosphericus	+		
		Bacillus aquimaris			+
		Bacillus aryabhattai		+	
		Bacillus aurantiacus			+
		Bacillus clarkii/Bacillus polygoni		+	
		Bacillus clausii		+	
		Bacillus flexus	+		
		Bacillus hemicellulosilyticus			+
		*Bacillus horikoshii**	+		+
		Bacillus horti		+	
		*Bacillus hunanensis**	+		+
		Bacillus hunanensis/Bacillus oshimensis			+
		Bacillus hwajinpoensis			+
		Bacillus lehensis		+	
		*Bacillus licheniformis**		+	+
		Bacillus marisflavi		+	
		*Bacillus megaterium**	+	+	
		Bacillus neizhouensis	+		
		*Bacillus oshimensis**	+		+
		Bacillus pseudalcaliphilus			+
		Bacillus pumilus		+	
		*Bacillus vietnamensis**	+		+
		Bacillus wakoensis			+
family Bacillaceae 2	*Gracilibacillus* (1)	*Gracilibacillus dipsosauri*	+		
	Halobacillus (2)	*Halobacillus kuroshimensis**	+	+	+
		*Halobacillus trueperi**		+	+
	Oceanobacillus (3)	*Oceanobacillus kimchii*		+	
		Oceanobacillus oncorhynchi	+		
		Oceanobacillus sojae	+		
	Thalassobacillus (1)	*Thalassobacillus devorans*	+		
	Virgibacillus (3)	*Virgibacillus dokdonensis*	+		
		*Virgibacillus halodenitrificans**		+	+
		Virgibacillus marismortui		+	
family Planococcaceae	*Jeotgalibacillus* (1)	*Jeotgalibacillus campisalis**	+		+
family Staphylococcaceae	*Staphylococcus* (1)	*Staphylococcus warneri*		+	
phylum Proteobacteria class gamma	*Halomonas* (1)	*Halomonas meridiana*			+
	Marinobacter (1)	*Marinobacter alkaliphilus*			+
	Photobacterium (2)	*Photobacterium lutimaris*	+		
		*Photobacterium rosenbergii**		+	+
	Pseudomonas (3)	*Pseudomonas cedrina**		+	+
		*Pseudomonas libanensis**	+	+	+
		Pseudomonas synxantha		+	
	Vibrio (5)	*Vibrio agarivorans*			+
		Vibrio harveyi		+	
		Vibrio mediterranei	+		
		*Vibrio pomeroyi**	+	+	
		*Vibrio rotiferianus**	+		+

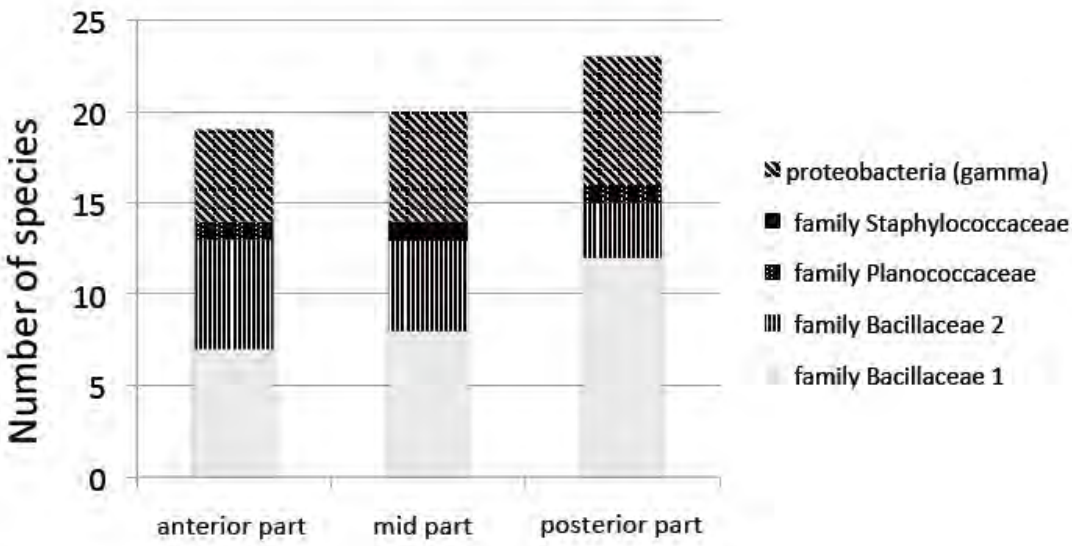

Fig.3 Number of the species of isolates in each part of the intestine
The species were divided into five groups: the family Bacillaceae 1 (gray box), the family Bacillaceae 2 (vertical stripes), the family Planococcaceae (dotted box), the family Staphylococcaceae (black box) and the order γ-Proteobacteria (diagonal stripes box). Fig.3 was summarized from Supplementary Tables 1.

Polysaccharide degradation ability of isolates

Many isolates from the specimen showed polysaccharides degradation ability and degraded one or more substrates (S, CMC, AL and XL). Twenty-eight, 12, 3 and 12 species showed amylase activity, cellulase activity, alginate lyase activity and xylanase activity, respectively (Fig.4, Supplementary Table 1). No agarase activity was observed in all isolates.

Amylase producing isolates were mainly affiliated with the genus *Bacillus* (15 species). Twelve species such as *Bacillus horikoshii*, *B. hunanensis, B. licheniformis, B. megaterium, B. vietnamensis, Halobacillus kuroshimensis, H. trueperi, Photobacterium rosenbergii, Pseudomonas cedrina, P. libanensis, Vibrio pomeroyi,* and *V. rotiferianus* were found in multiple locations of three parts, i.e. anterior, mid and posterior parts of the intestine.

Most cellulase positive isolates belonged to the genera *Bacillus* (5 species) and *Vibrio* (4species). Three species such as *Jeotgalibacillus campisalis, Vibrio pomeroyi* and *V. rotiferianus* were found in multiple locations. Only 3 isolates producing alginate-lyase were affiliated with *Gracilibacillus dipsosauri, Pseudomonas synxantha* and *Vibrio agarivorans.* All isolates producing xylanase were most closely related to the genera *Bacillus* (9 species) and *Pseudomonas* (3 species). One species, *Pseudomonas libanensis* was found in multiple locations.

Several species showed multiple polysaccharides degradation activities. On the other hand, 11 species had no polysaccharides degradation ability and 7 species of them in the anterior or mid parts of the intestine belonged to the family Bacillaceae 2 but the number of them decreased in the posterior part of the intestine (Fig.4). It was observed that in the posterior part, the number of xylan degrading species related to the family Bacilliaceae 1 increased and the number of starch degrading species related to the order γ-Proteobacteria also increased (Fig.4).

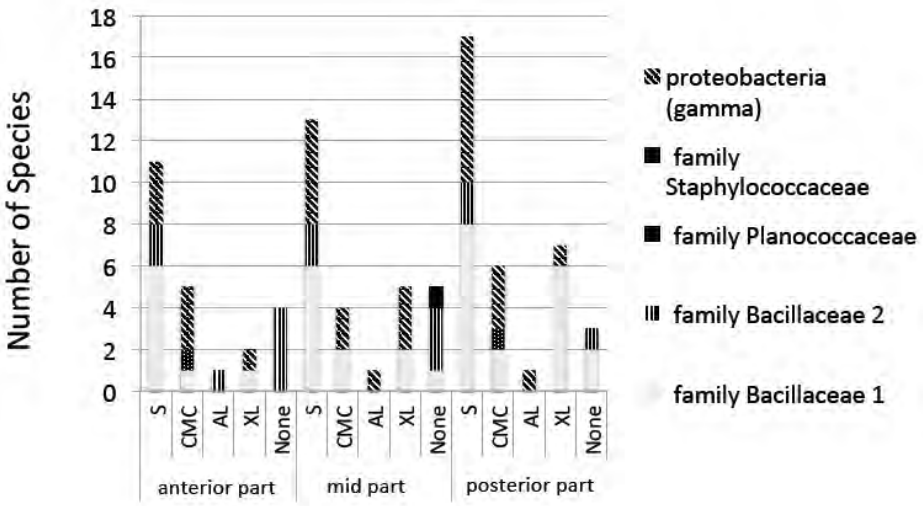

Fig.4 Number of the species of isolates degrading various polysaccharides
The species were divided into five groups as shown in Fig.3. S, CMC, AL, XL and None indicated starch degradation activity (S), CMC degradation activity (CMC), alginate degradation activity (AL), xylan degradation activity (XL) and no degradation activity (None), respectively. No isolates showed agarase activity. Fig.4 was summarized from Supplementary Tables 1.

Physiological characteristics of the isolates

Fig.5 and Supplementary Table 1 showed effect of anaerobic condition for growth of the isolates. The isolates were divided into three groups, facultative anaerobic bacteria (FA), anaerobic tolerant bacteria (AT) and aerobic bacteria (A). Twenty-five FA species were mainly affiliated with the phylum Proteobacteria and the family Bacillaceae 1. Six species such as *Bacillus licheniformis, Photobacterium rosenbergii, Pseudomonas cedrina, P. libanensis, Vibrio pomeroyi* and *V. rotiferianus* were found in multiple locations. Thirty AT species were mainly affiliated to the genera *Bacillus* (16 species), *Gracilibacillus, Halobacillus, Oceanobacillus* and *Virgibacillus*. Only one aerobic (A) species, *Halobacillus kuroshimensis* was found in multiple locations. The species belonging to the family Bacillaceae 2 were mainly affiliated to AT group and species belonging to the family Bacillaceae 1 were mainly affiliated to FA or AT groups (Fig.5). The species belonging to the phylum Proteobacteria were mainly affiliated to FA group (Fig.5).

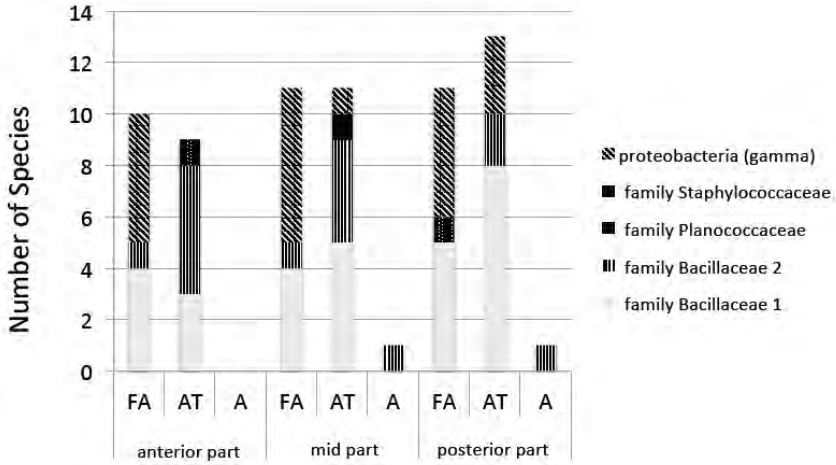

Fig.5 Number of the species of isolates classified by effect of oxygen on the growth
The species were divided into five groups as shown in Fig.3. Facultative anaerobic bacteria (FA) form colony in both aerobic and anaerobic cultivation. Anaerobic tolerant bacteria (AT) do not form colony in anaerobic condition for two weeks but form colony in aerobic cultivation after the anaerobic cultivation. Aerobic bacteria (A) do not form colony in anaerobic condition for two weeks and also do not form colony in aerobic cultivation after the anaerobic cultivation. Fig.5 was summarized from Supplementary Tables 1.

High salt concentration or high pH were used for isolation conditions to isolate various bacteria because marine water is semi-alkaline pH and contains 3.5% NaCl. Salinity tolerance of the isolates was examined (Fig.6, and Supplementary Table 1; JJSE Web site). The isolates most closely related to *Halobacillus kuroshimensis* and *Bacillus clausii* showed the highest salt tolerance (25 % NaCl) and some strains were able to grow in absent of NaCl. Twelve species were halophilic (20-25% NaCl conc.) and mainly belonged to the family Bacillaceae 2, the genera *Halobacillus, Virgibacillus* and *Oceanobacillus*. Thirty-two species were moderate halophilic (10-) and 18 species belonged to the family Bacillaceae 1, the genus *Bacillus* and 9 species belonged to γ-proteobacteria such as the genera *Pseudomonas*, *Vibrio* and *Photobacterium.*Seven species were slight halophiles (3.5% NaCl) belonged to the genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Jeotgalibacillus Bacillus*. It appears that the species belonging to the family Bacillaceae 2 are most salt-tolerant (more than 20% NaCl) and those belonging to the phylum Proteobacteria or the family Bacillaceae 1 were moderate halophilic (10-) (Fig.6). It was observed that number of species related to slight halophiles (3.5%) decreased in the posterior part compared with those in other parts.

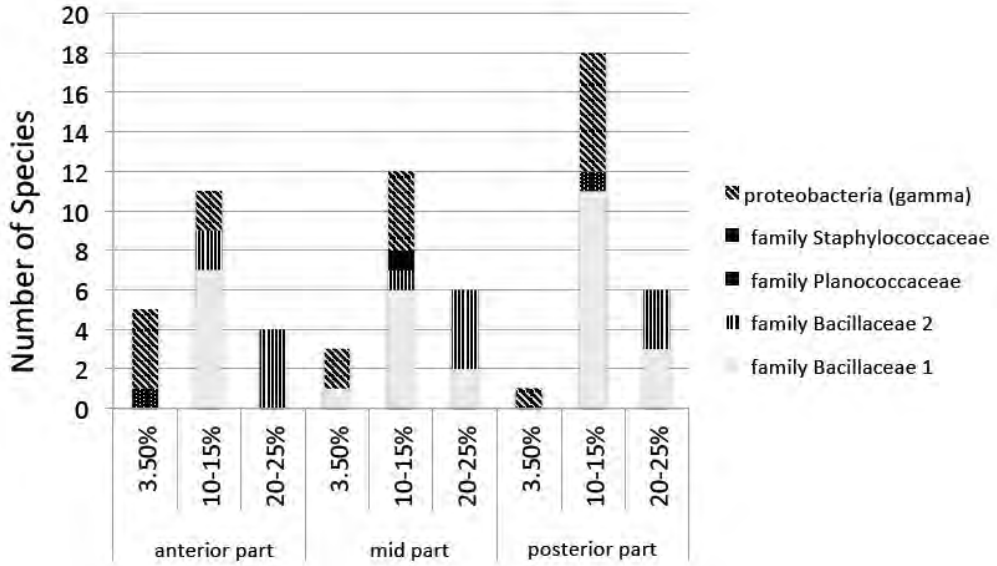

Fig.6 Number of the species of isolates classified by effect of NaCl concentration on the growth
The species were divided into five groups as shown in Fig.3. Fig.6 was summarized from Supplementary Tables 1.

All isolates were examined for growth responses to pH shift (pH7→pH10 or pH10→pH7. All alkaliphilic/alkali-tolerant strains isolated from alkali medium were able to grow at pH 7, while half of species isolated from pH 7 were able to grow at pH 10. Nineteen species were the neutrophilic species (NE) growing only at pH7. Eleven species were affiliated with the genus *Bacillus*.

Discussion

In this report, we isolated aerobic culturable bacteria from each part of the gut of deep-sea holothurian using different culture conditions. The deep-sea holothurian was collected at southeast of Fukue Island, Nagasaki, Japan (32°30′N, 129°09′E), at a water depth of 236 m in November 21, 2010. Ninety-two aerobic culturable bacterial strains were isolated from each part of the intestine of deep-sea holothurian. By partial 16S rRNA gene sequences of the isolates, the isolates belonged to 45 species. The bacterial diversity was similar among three parts, i.e. anterior, mid and posterior parts of the intestine and 14 species were detected in multiple parts of the intestine. But, the number of species belonged to the family Bacillaceae 2 decreased in the posterior part of the intestine compared with those in the anterior or mid parts of the intestine. (We will discuss this later.)

As shown in Table2, the isolates belonged to the phyla Firmicutes (33 species) and Proteobacteria (12 species). Among 33 species of the phylum Firmicutes, 21 species belonged to the family Bacillaceae 1, the genus *Bacillus*. Recently, Enomoto et al. reported that Proteobacteria members were mainly isolated as culturable bacteria from the intestine of *Apostichopus japonicus*[3]. These results suggested that the sea environments such as deep sea or intertidal areas maybe affected diversity of aerobic culturable bacteria.

Detritus is organic materials and is used as a source of nutrient for detritus feeders[5]. Most important

components of detritus are recalcitrant polysaccharides and bacteria are the main decomposers that degrade these materials. Therefore, we analyzed polysaccharide degradation of the isolates. We found that many isolates showed various polysaccharide degradation activities. High diversity was observed in starch degradation isolates, suggesting the large amount storage of starch in detritus, for example algae. But, there were few isolates showing alginate or agar degradation activities probably because deep-sea was not suitable area for seaweeds which contained a lot of alginate or agar. As mentioned in Fig.4, 11 species had no polysaccharides degradation ability and 7 species of them in the anterior or mid parts of the intestine belonged to the family Bacillaceae 2 but the number of them decreased in the posterior part of the intestine. It was observed that in the posterior part, the number of xylan degrading species related to the family Bacilliaceae 1 increased and the number of starch degrading species related to the order γ-Proteobacteria also increased (Fig.4). It was also observed that number of species related to slight halophiles (3.5%) decreased in the posterior part compared with those in other parts. These results suggested that the posterior part had a different role or environment compared with the anterior or mid parts, maybe the posterior part was involved in the digestion of polysaccharides.

We found that almost all isolates were facultative anaerobic bacteria or anaerobic tolerant bacteria. It appears that oxygen will enter the intestine of the sea cucumber from the mouth with the detritus food and also some amount can penetrate from the body tissues. These results suggested that the aerobic culturable isolates potentially contributed to digest detritus and supply metabolic products (minor components and vitamins) to their host sea cucumber.

Three isolates (isolate no. C214, C254 and C271) showed less than 96% identities with any type strain sequences and two of them were obtained from alkaline plates and 10% NaCl. These results suggested that the intestines of deep-sea holothurians were still new resource for new species.

The temperature of seawater at the water depth of the sampling point was estimated to be ca.13-14 °C in November 2010 from data of Japan Meteorological Agency. But, it was surprising that the full year temperature of the sampling point was estimated to be ca.12-15 °C throughout the year (from data in Japan Meteorological Agency). These results suggested that this deep-sea environment seemed a little low temperature but more suitable environment for deep-sea holothurian and their intestinal bacteria.

In this study, only one specimen, deep-sea holothurian was obtained and investigated. Therefore, future challenges remain regarding individual variations, morphological descriptions, haplotypes of host species and surrounding environments including sediments.

Acknowledgments

Authors thank the captain and crews of TS Nagasaki maru who made it possible to collect a deep-sea cucumber. Authors are grateful for the support provided by Dr. Asami Yoshida in Graduate School of Fisheries Science and Environmental Studies, Nagasaki University for DNA sequencing analysis. This work was partially supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (C) to T. K.

References

1) Amaro, T., Luna, G.M., Danovaro, R., Billett, D.S.M., and Cunha, M.R. 2012. High prokaryotic biodiversity associated with gut contents of the holothurian *Molpadia musculus* from the Nazaré Canyon (NE Atlantic). Deep-Sea Research I. 63: 82-90.
2) Amaro, T., Witte, H., Herndl, G.J., Cunha, M.R., and Billett, D.S.M. 2009. Deep-sea bacterial communities in sediments and guts of deposit-feeding holothurians in Portuguese canyons (NE Atlantic). Deep-Sea Research I. 56: 1834-1843.
3) Enomoto, M., Nakagawa, S., and Sawabe, T. 2012. Microbial Communities Associated with Holothurians: Presence of Unique Bacteria in the Coelomic Fluid. Microbes Environ., Advance Publication, Release Date: March 23,2012.
4) Foster, G.G., and Hodgson, A.N. 1995. Annual reproductive cycles of three sympatric species of intertidal holothurians (Echinodermata) from the coast of the Eastern Cape Province of South Africa. Invertebr. Reprod. Dev. 27: 49-59.
5) Hagen, E.M., McCluney, K.E., Wyant, K.A., Soykan, C.U., Keller, A.C., Luttermoser, K.C., Holmes, E.J., Moore, J.C., Sabo, J.L. 2012. A meta-analysis of the effects of detritus on primary producers and consumers in marine, freshwater, and terrestrial ecosystems. Oikos, Article first published online: 31 JAN 2012 | DOI: 10.1111/j.1600-0706.2011.19666. x.
6) Massin, C. 1982. Food and feeding mechanisms, Holothuroidea. In Echinoderm Nutrition, ed. by Jangoux, M. and Lawrence, J.M., Balkema, Rotterdam, pp. 43-55.

7) Moriarty, D.J.W. 1982. Feeding of *Holothuria atra* and *Stichopus chloronotus* on Bacteria, Organic Carbon and Organic Nitrogen in Sediments of the Great Barrier Reef. Aust. J. Mar. Freshwater Res. 33: 255-263.
8) Shimizu, M., Mikami, I., and Takahashi, K. 1992. Histochemical detection on the ontogenic development of digestive enzymes in the intestine of a juveni1e sea cucumber *Stichopus japonicas.* Bulletin of the faculty of Fisheries Hokkaido University 45: 1-8.
9) Uthicje, S., Schaffelke, B., and Byrne, M. 2009. A boom and bust phylum? Ecological and evolutionary consequences of density variations in echinoderms. Ecological Monographs. 79: 3-24.
10) Ward-Rainey, N., Rainey, F.A., and Stackebrandt, E. 1996. A study of the bacterial flora associated with *Holothuria atra*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 203: 11-26.
11) Yingst, J.Y. 1976. The utilisation of organic matter in shallow marine sediments by an epibenthic deposit-feeding Holothurian. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 23: 55-69.

Supplementary Table 1

Isolate No.	Accession number of isolates	isolation medium	letters	part of the intestine	Accession nnumber of type strain	species/tentative species	Identities	Degrading activities on polysaacharides				Requiment of oxygen	Maximum NaCl concentration for growth	pH tolerance	phylum	family
								S	CMC	AL	XL					
C210	AB741781	LB(pH7,3.5%)	528	mid	EF114313	*Bacillus aryabhattai*	522/522 (100%)	+	+	-	-	FA	10	NE	firmicutes	family Bacillaceae 1
C212	AB741782	LB(pH7,3.5%)	818	mid	AF483624	*Bacillus marisflavi*	818/818 (100%)	-	-	-	+	AT	20	NE	firmicutes	family Bacillaceae 1
C214	AB741783	LB(pH7,3.5%)	623	mid	AJ009793	*Virgibacillus marismortui*	555/577 (96%)	-	-	-	-	AT	15	ALK	firmicutes	family Bacillaceae 2
C219	AB741784	LB(pH7,3.5%)	825	mid	AJ310149	*Halobacillus trueperi*	816/825 (98%)	+	-	-	-	AT	20	ALK	firmicutes	family Bacillaceae 2
C220	AB741785	LB(pH7,3.5%)	819	mid	L37603	*Staphylococcus warneri*	819/819 (100%)	-	-	-	-	AT	15	NE	firmicutes	family Staphylococcaceae
C221	AB741786	LB(pH7,3.5%)	509	mid	AJ491290	*Vibrio pomeroyi*	503/509 (98%)	+	+	-	-	FA	3.5	ALK	proteobacteria	gamma
C234	AB741787	CMC(pH10,10%)	817	posterior	HM054473	*Bacillus hunanensis*	816/817 (99%)	+	-	-	-	AT	20	ALK	firmicutes	family Bacillaceae 1
C235	AB741788	CMC(pH10,10%)	813	posterior	AB125942	*Marinobacter alkaliphilus*	807/813 (99%)	+	-	-	-	AT	15	ALK	proteobacteria	gamma
C236	AB741789	CMC(pH10,3.5%)	594	anterior	AY190535	*Jeotgalibacillus campisalis*	590/594 (99%)	-	+	-	-	AT	3.5	ALK	firmicutes	family Planococcaceae
C240	AB741790	CMC(pH10,3.5%)	499	mid	X76440	*Bacillus clausii*	497/499 (99%)	+	-	-	-	AT	15	ALK	firmicutes	family Bacillaceae 1
C241	AB741791	CMC(pH10,3.5%)	589	mid	D87035	*Bacillus horti*	585/589 (99%), Gaps = 1/589 (0%)	+	-	-	-	AT	3.5	ALK	firmicutes	family Bacillaceae 1
C242	AB741792	CMC(pH10,3.5%)	540	mid	AJ842344	*Photobacterium rosenbergii*	537/540 (99%)	+	-	-	-	FA	3.5	ALK	proteobacteria	gamma
C243	AB741793	CMC(pH10,3.5%)	797	mid	D87035	*Bacillus horti*	791/797 (99%), Gaps = 2/797 (0%)	+	-	-	-	AT	3.5	ALK	firmicutes	family Bacillaceae 1
C245	AB741794	CMC(pH10,3.5%)	812	mid	GU784860	*Oceanobacillus kimchii*	807/812 (99%)	-	-	-	-	FA	20	ALK	firmicutes	family Bacillaceae 2
C246	AB741795	CMC(pH10,3.5%)	574	posterior	AB188090	*Bacillus oshimensis*	571/574 (99%)	-	-	-	-	FA	15	ALK	firmicutes	family Bacillaceae 1
C247	AB741796	CMC(pH10,3.5%)	427	posterior	AJ492830	*Pseudomonas cedrina*	425/427 (99%)	+	-	-	-	FA	15	ALK	proteobacteria	gamma
C254	AB741797	AL(pH10,10%)	453	anterior	AJ717299	*Thalassobacillus devorans*	437/453 (96%)	-	-	-	-	AT	20	ALK	firmicutes	family Bacillaceae 2
C258	AB741798	AL(pH10,3.5%)	621	anterior	EU925618	*Bacillus neizhouensis*	609/616 (98%)	-	-	-	+	FA	15	ALK	firmicutes	family Bacillaceae 1
C259	AB741799	AL(pH10,3.5%)	715	anterior	AJ316187	*Vibrio rotiferianus*	691/699 (98%)	-	+	-	-	FA	3.5	ALK	proteobacteria	gamma
C263	AB741800	AL(pH10,3.5%)	524	posterior	AF057645	*Pseudomonas libanensis*	523/524 (99%)	+	+	-	-	AT	10	ALK	proteobacteria	gamma
C265	AB741801	XL(pH10,10%)	535	anterior	AB188090	*Bacillus oshimensis*	530/535 (99%)	+	-	-	-	AT	15	ALK	firmicutes	family Bacillaceae 1
C270	AB741802	XL(pH10,10%)	565	posterior	HM054473	*Bacillus hunanensis*	565/565 (100%)	+	-	-	-	AT	15	ALK	firmicutes	family Bacillaceae 1
C271	AB741803	XL(pH10,10%)	764	posterior	AJ605773	*Bacillus aurantiacus*	732/759 (96%), Gaps = 6/759 (0%)	+	-	-	+	AT	20	ALK	firmicutes	family Bacillaceae 1
C277	AB741804	XL(pH10,3.5%)	677	anterior	AB043865	*Bacillus horikoshii*	675/677 (99%), Gaps = 1/677 (0%)	+	-	-	-	AT	10	ALK	firmicutes	family Bacillaceae 1
C280	AB741805	XL(pH10,3.5%)	544	mid	D84025	*Pseudomonas synxantha*	540/544 (99%)	+	-	+	+	FA	10	ALK	proteobacteria	gamma
C281	AB741806	XL(pH10,3.5%)	475	mid	X76444/AB292819	*Bacillus clarkii/Bacillus polygoni*	474/475 (99%)	+	-	-	-	AT	15	ALK	firmicutes	family Bacillaceae 1
C285	AB741807	XL(pH10,3.5%)	581	posterior	AY190535	*Jeotgalibacillus campisalis*	581/583 (99%), Gaps = 1/583 (0%)	-	+	-	-	FA	10	ALK	firmicutes	family Planococcaceae
C287	AB741808	XL(pH10,3.5%)	637	posterior	HM054473/AB188090	*Bacillus hunanensis/Bacillus oshimensis*	634/637 (99%)	+	-	-	-	AT	15	ALK	firmicutes	family Bacillaceae 1
C288	AB741809	XL(pH10,3.5%)	772	posterior	X76449	*Bacillus pseudalcaliphilus*	743/760 (97%)	+	-	-	+	FA	10	ALK	firmicutes	family Bacillaceae 1
C291	AB741810	XL(pH10,3.5%)	521	posterior	AB043851	*Bacillus wakoensis*	521/521 (100%)	-	-	-	+	FA	15	ALK	firmicutes	family Bacillaceae 1
C295	AB741811	S(pH10,3.5%)	515	anterior	DQ534014	*Photobacterium lutimaris*	512/515 (99%)	+	-	-	-	FA	3.5	ALK	proteobacteria	gamma
C298	AB741812	S(pH10,3.5%)	816	anterior	HM054473	*Bacillus hunanensis*	815/816 (99%)	+	-	-	-	FA	15	ALK	firmicutes	family Bacillaceae 1
C302	AB741813	S(pH10,3.5%)	411	anterior	X74710	*Vibrio mediterranei*	407/411 (99%)	-	+	-	-	FA	3.5	ALK	proteobacteria	gamma
C304	AB741814	S(pH10,3.5%)	540	mid	AJ842344	*Photobacterium rosenbergii*	535/540 (99%)	+	-	-	-	FA	10	ALK	proteobacteria	gamma
C305	AB741815	S(pH10,3.5%)	683	mid	X76440	*Bacillus clausii*	673/677 (99%)	+	-	-	-	FA	10	ALK	firmicutes	family Bacillaceae 1
C307	AB741816	S(pH10,3.5%)	550	posterior	AB043846	*Bacillus hemicellulosilyticus*	547/550 (99%)	+	+	-	+	AT	10	ALK	firmicutes	family Bacillaceae 1
C309	AB741817	S(pH10,3.5%)	565	posterior	AJ842344	*Photobacterium rosenbergii*	560/565 (99%)	-	+	-	-	FA	10	ALK	proteobacteria	gamma
C310	AB741818	S(pH10,3.5%)	623	posterior	AF057645	*Pseudomonas libanensis*	619/623 (99%)	+	-	-	-	AT	15	ALK	proteobacteria	gamma
C312	AB741819	S(pH10,3.5%)	516	posterior	AJ310647	*Vibrio agarivorans*	505/516 (97%)	+	-	+	-	FA	10	ALK	proteobacteria	gamma
C313	AB741820	S(pH10,3.5%)	388	posterior	AB043865	*Bacillus horikoshii*	388/388 (100%)	+	-	-	-	FA	10	ALK	firmicutes	family Bacillaceae 1
C317	AB741821	CMC(pH7,10%)	580	anterior	AB099708	*Bacillus vietnamensis*	579/580 (99%)	+	-	-	-	FA	10	NE	firmicutes	family Bacillaceae 1
C318	AB741822	CMC(pH7,10%)	780	anterior	AJ831844/AJ831842	*Bacillus aerophilus/Bacillus altitudinis*	780/780 (100%)	-	-	-	-	AT	10	NE	firmicutes	family Bacillaceae 1
C324	AB741823	CMC(pH7,10%)	569	mid	AY543169	*Virgibacillus halodenitrificans*	568/569 (99%)	-	-	-	-	AT	20	NE	firmicutes	family Bacillaceae 2
C327	AB741824	CMC(pH7,10%)	811	mid	AB195680	*Halobacillus kuroshimensis*	808/811 (99%), Gaps = 2/811 (0%)	+	-	-	-	AT	25	NE	firmicutes	family Bacillaceae 2
C333	AB741825	CMC(pH7,10%)	679	posterior	AY543169	*Virgibacillus halodenitrificans*	675/676 (99%)	-	-	-	-	AT	20	NE	firmicutes	family Bacillaceae 2
C334	AB741826	CMC(pH7,10%)	586	posterior	CP000002	*Bacillus licheniformis*	580/580 (100%)	+	-	-	-	FA	15	NE	firmicutes	family Bacillaceae 1
C335	AB741827	CMC(pH7,10%)	808	posterior	AJ310149	*Halobacillus trueperi*	806/808 (99%)	+	-	-	-	AT	20	NE	firmicutes	family Bacillaceae 2
C336	AB741828	CMC(pH7,10%)	740	posterior	AF483625	*Bacillus aquimaris*	735/740 (99%)	+	-	-	-	AT	15	NE	firmicutes	family Bacillaceae 1
C339	AB741829	AL(pH7,10%)	589	anterior	AJ640134	*Oceanobacillus oncorhynchi*	577/589 (97%)	-	-	-	-	AT	20	ALK	firmicutes	family Bacillaceae 2
C341	AB741830	AL(pH7,10%)	558	anterior	AJ831842/AJ831841	*Bacillus altitudinis/Bacillus stratosphericus*	558/558 (100%)	-	-	-	-	AT	10	NE	firmicutes	family Bacillaceae 1
C344	AB741831	AL(pH7,10%)	768	anterior	AJ831844/AJ831842	*Bacillus aerophilus/Bacillus altitudinis*	768/768 (100%)	-	-	-	-	AT	10	NE	firmicutes	family Bacillaceae 1
C347	AB741832	AL(pH7,10%)	704	anterior	AY822043	*Virgibacillus dokdonensis*	691/704 (98%)	-	-	-	-	AT	10	NE	firmicutes	family Bacillaceae 2

C350	AB741833	AL(pH7,10%)	823	mid	AB195680	*Halobacillus kuroshimensis*	816/820 (99%), Gaps = 3/820 (0%)	+	-	-	-	A	20	NE	firmicutes	family Bacillaceae 2
C355	AB741834	AL(pH7,10%)	684	mid	AB195680	*Halobacillus kuroshimensis*	682/685 (99%), Gaps = 2/685 (0%)	+	-	-	-	AT	20	NE	firmicutes	family Bacillaceae 2
C358	AB741835	AL(pH7,10%)	753	posterior	AF541966	*Bacillus hwajinpoensis*	746/749 (99%), Gaps = 1/749 (0%)	-	-	-	-	AT	15	NE	firmicutes	family Bacillaceae 1
C359	AB741836	AL(pH7,10%)	528	posterior	CP000002	*Bacillus licheniformis*	528/528 (100%)	+	-	-	-	AT	10	NE	firmicutes	family Bacillaceae 1
C360	AB741837	AL(pH7,10%)	557	posterior	AB099708	*Bacillus vietnamensis*	557/557 (100%)	+	-	-	-	AT	10	NE	firmicutes	family Bacillaceae 1
C361	AB741838	AL(pH7,10%)	665	posterior	AY543169	*Virgibacillus halodenitrificans*	663/665 (99%)	-	-	-	-	AT	20	NE	firmicutes	family Bacillaceae 2
C362	AB741839	AL(pH7,10%)	813	posterior	AB195680	*Halobacillus kuroshimensis*	810/814 (99%), Gaps = 2/814 (0%)	+	-	-	-	A	25	NE	firmicutes	family Bacillaceae 2
C365	AB741840	AL(pH7,10%)	772	posterior	AF483625	*Bacillus aquimaris*	760/772 (98%)	+	-	-	-	AT	15	NE	firmicutes	family Bacillaceae 1
C367	AB741841	AL(pH7,10%)	520	posterior	AF541966	*Bacillus hwajinpoensis*	515/520 (99%)	-	-	-	-	AT	20	NE	firmicutes	family Bacillaceae 1
C370	AB741842	XL(pH7,10%)	420	anterior	AB101591	*Gracilibacillus dipsosauri*	420/420 (100%)	+	-	+	-	AT	15	ALK	firmicutes	family Bacillaceae 2
C375	AB741843	XL(pH7,10%)	598	anterior	AB473561	*Oceanobacillus sojae*	596/598 (99%)	-	-	-	-	AT	20	ALK	firmicutes	family Bacillaceae 2
C377	AB741844	XL(pH7,10%)	760	anterior	AB195680	*Halobacillus kuroshimensis*	758/761 (99%), Gaps = 2/761 (0%)	+	-	-	-	FA	25	ALK	firmicutes	family Bacillaceae 2
C379	AB741845	XL(pH7,10%)	533	mid	CP000002	*Bacillus licheniformis*	531/532 (99%)	+	-	-	-	FA	15	ALK	firmicutes	family Bacillaceae 1
C380	AB741846	XL(pH7,10%)	535	mid	X76440	*Bacillus clausii*	534/535 (99%)	-	-	-	-	AT	25	NE	firmicutes	family Bacillaceae 1
C381	AB741847	XL(pH7,10%)	836	mid	AB195680	*Halobacillus kuroshimensis*	831/837 (99%), Gaps = 2/837 (0%)	+	-	-	-	A	20	ALK	firmicutes	family Bacillaceae 2
C392	AB741848	XL(pH7,10%)	655	posterior	CP000002	*Bacillus licheniformis*	653/655 (99%)	+	-	-	+	FA	15	NE	firmicutes	family Bacillaceae 1
C397	AB741849	XL(pH7,10%)	568	posterior	AJ842344	*Photobacterium rosenbergii*	565/569 (99%), Gaps = 1/569 (0%)	+	-	-	-	FA	15	NE	proteobacteria	gamma
C416	AB741850	S(pH7,10%)	711	mid	CP000002	*Bacillus licheniformis*	710/711 (99%)	+	-	-	-	FA	15	NE	firmicutes	family Bacillaceae 1
C417	AB741851	S(pH7,10%)	672	posterior	CP000002	*Bacillus licheniformis*	671/672 (99%)	+	+	-	-	FA	15	NE	firmicutes	family Bacillaceae 1
C431	AB741852	S(pH7,10%)	777	posterior	AY543169	*Virgibacillus halodenitrificans*	777/777 (100%)	-	-	-	-	AT	20	NE	firmicutes	family Bacillaceae 2
C435	AB741853	CMC(pH7,3.5%)	706	anterior	AJ491290	*Vibrio pomeroyi*	699/706 (99%), Gaps = 1/706 (0%)	+	+	-	-	FA	3.5	ALK	proteobacteria	gamma
C442	AB741854	CMC(pH7,3.5%)	531	mid	AJ491290	*Vibrio pomeroyi*	525/531 (98%)	+	+	-	-	FA	3.5	ALK	proteobacteria	gamma
C444	AB741855	CMC(pH7,3.5%)	421	mid	D16273	*Bacillus megaterium*	417/421 (99%)	+	+	-	-	AT	10	NE	firmicutes	family Bacillaceae 1
C446	AB741856	CMC(pH7,3.5%)	568	mid	AY876289	*Bacillus pumilus*	568/569 (99%)	-	-	-	+	FA	10	NE	firmicutes	family Bacillaceae 1
C460	AB741858	AL(pH7,3.5%)	477	anterior	AJ491290	*Vibrio pomeroyi*	471/477 (98%)	+	+	-	-	FA	3.5	ALK	proteobacteria	gamma
C463	AB741859	AL(pH7,3.5%)	462	mid	AF057645	*Pseudomonas libanensis*	461/462 (99%)	+	-	-	-	AT	10	ALK	proteobacteria	gamma
C466	AB741860	AL(pH7,3.5%)	664	posterior	AJ316187	*Vibrio rotiferianus*	662/664 (99%)	+	+	-	-	FA	3.5	ALK	proteobacteria	gamma
C471	AB741861	XL(pH7,3.5%)	544	anterior	AF057645	*Pseudomonas libanensis*	542/544 (99%)	-	-	-	+	FA	15	NE	proteobacteria	gamma
C475	AB741862	XL(pH7,3.5%)	655	anterior	AJ316187	*Vibrio rotiferianus*	654/655 (99%)	+	+	-	-	FA	15	ALK	proteobacteria	gamma
C483	AB741863	XL(pH7,3.5%)	673	mid	AF057645	*Pseudomonas libanensis*	671/673 (99%)	+	-	-	+	AT	15	ALK	proteobacteria	gamma
C484	AB741864	XL(pH7,3.5%)	542	mid	AJ492830	*Pseudomonas cedrina*	540/542 (99%)	+	-	-	-	FA	15	ALK	proteobacteria	gamma
C487	AB741865	XL(pH7,3.5%)	535	mid	AY750575	*Vibrio harveyi*	529/535 (98%)	-	+	-	-	FA	15	ALK	proteobacteria	gamma
C494	AB741866	XL(pH7,3.5%)	761	posterior	AJ831844	*Bacillus aerophilus*	761/761 (100%)	-	-	-	+	AT	15	NE	firmicutes	family Bacillaceae 1
C503	AB741867	S(pH7,3.5%)	749	anterior	D16273	*Bacillus megaterium*	747/749 (99%)	+	-	-	-	FA	10	NE	firmicutes	family Bacillaceae 1
C506	AB741868	S(pH7,3.5%)	540	anterior	AB021185	*Bacillus flexus*	538/540 (99%)	+	+	-	-	AT	15	NE	firmicutes	family Bacillaceae 1
C512	AB741869	S(pH7,3.5%)	556	mid	AF057645	*Pseudomonas libanensis*	554/556 (99%)	+	-	-	+	FA	10	NE	proteobacteria	gamma
C520	AB741870	S(pH7,3.5%)	563	mid	AJ492830	*Pseudomonas cedrina*	561/564 (99%), Gaps = 1/564 (0%)	-	-	-	+	FA	15	NE	proteobacteria	gamma
C521	AB741871	S(pH7,3.5%)	669	mid	AY793550	*Bacillus lehensis*	668/669 (99%)	+	-	-	-	AT	15	ALK	firmicutes	family Bacillaceae 1
C528	AB741872	S(pH7,3.5%)	578	posterior	AF057645	*Pseudomonas libanensis*	576/578 (99%)	-	+	-	+	FA	10	NE	proteobacteria	gamma
C538	AB741873	S(pH7,10%)	746	posterior	AJ306891	*Halomonas meridiana*	746/746 (100%)	+	-	-	-	AT	15	ALK	proteobacteria	gamma

Abbreviations: S, starch; CMC, carboxymethyl cellulose sodium salt; AL, alginate; XL, xylan; FA, facultative anaerobic bacteria; AT, anaerobic tolerant bacteria; A, aerobic bacteria;NE, neutrophilic bacteria; ALK, alkaliphilic/alkali-tolerant bacteria . Display of more than one species in the column of nearest type strain species indicated the same idenntity in the comparison range.

ORIGINAL PAPER
NOTE

Journal of Japanese Society for Extremophiles (2012) Vol.11, 59-63

Ueno Y, Kato-Yamada Y and Imai T

Hydrophobic shield on the molecular surface enhances thermal stability of ferredoxin of *Cyanidioschyzon merolae*

Department of Life Science, College of Science, Rikkyo University, Nishi-Ikebukuro Toshima-ku, Tokyo 171-8501, Japan

Correspondence author: Yuko Ueno, y.ueno@rikkyo.ac.jp
Tel: +81-3-3985-2386 Fax: +81-3-3985-2386

Received: Nobember 8, 2012 / Accepted: November 19, 2012

Abstract Ferredoxin from *Cyanidioschyzon merolae*, a moderately thermophilic unicellular alga, has a hydrophobic interaction between two solvent-exposed residues, V53 and V87, which are specific for thermophilic ferredoxins. This interaction is located on two β-strands, which are part of a β-grasp motif constructing ferredoxin. Point mutations were designed to those two residues, which were participating in this surface hydrophobic interaction, and it was revealed that the thermal stability of the V87A mutant was largely decreased compared to that of the wild type (WT). The result suggested an example for the finding that surface hydrophobicity affected protein thermal stability.

Key words: Ferredoxin; thermal stability, hydrophobicity, β-grasp motif, *Cyanidioschyzon merolae*

Abbreviations

Cm: *Cyanidioschyzon merolae*
So: *Spinacia oleracea*
Ml: *Mastigocladus laminosus*
Fd: Ferredoxin
WT: Wild type
CmFd: *Cyanidioschyzon merolae* ferredoxin
SoFd: *Spinacia oleracea* ferredoxin
MlFd: *Mastigocladus laminosus* ferredoxin
SoFd-NADP reductase: *Spinacia oleracea* ferredoxin nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (oxidized form) reductase
NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form)

One of the most generally recognized factors for enhancing the protein thermal stability is to increase the packing density of the hydrophobic core[5,12]. In addition, amino acid substitution at the surface has been shown to have little effect on protein thermal stability[10,17]. However, examples that few point mutations at the surface drastically increase the proteins thermal stability have been also reported[15,19]. The factors that enhance the protein's thermalstablity seem to vary with regard to the proteins to be focused on and general concepts to raise the thermal stability are still a matter of debate.

Cyanidioschyzon merolae (Cm) is a moderately thermophilic red alga, whose optimum growth temperature is 42°C–50°C. It is also a unique thermophile that is positioned as a primitive eukaryote cell according to its simple organelle structure[11]. Ferredoxin (Fd) is an iron-sulfur protein present in many life forms where it acts as a multifunctional electron carrier[9,18]. The β-grasp motif is a protein motif that forms the core of Fd with five β-strands and one α-helix[2,8,14]. This motif is also present in ubiquitin, one of the most phylogenetically well-conserved proteins in eukaryotes and several other proteins with biologically distinct functions. In many studies of thermostability of proteins, more thermophilic or hyperthermophilic proteins are used because of their attractive features. However, we chose to compare a moderately thermophilic protein with the mesophilic protein from *Spinacia oleracea* (So)[1] because it has more similarities in its primary, secondary, and tertiary structures, and has still approximately 20°C difference in thermal stability[20], which may unobtrusively carries a unified set of rules for protein thermal stability.

By comparing the structure of the plant-type [2Fe-2S] ferredoxin from Cm and So (a mesophilic higher-plant), we found that CmFd has a specific hydrophobic interaction occurs on the surface of the protein as building up a hydrophobic shield that is likely to protect the β-sheet structure. In this study, by introducing point mutations into this region, we examined the effect of surface hydrophobic interactions on the protein thermal stability.

All mutants were prepared by inverse polymerase chain reaction with the KOD-Plus-Mutagenesis Kit (TOYOBO). We used the pTTQ18 vector (Amersham Pharmacia Biotech) that carries the WT Fd gene as a template. The V87A mutant was prepared by using two oligonucleotide primers, *i.e.*, forward primer (bold letters are the mutational points): 5′-GCCATTCAAACTCATCAAGAAGAAGCT-3′, and reverse primer: 5′-**GCA**ATCAGAAGTAGGATATGC-AACACAGGTTAG-3′. The sequences of the V87T mutant primers were as follows: forward 5′-GT**ACT**AT-TCAAACTCATCAAGAAGAAGC-3′, reverse 5′-AAT-CAGAAGTAGGATATGCAACACAGG-3′. Those of the V53K mutant primers were as follows: forward 5′-**AAG**AAAGGATCCGTGGATCAATCTGATC-3′, reverse 5′-TAATTTGCCTGCGCAAGTAGAGCAAG-3′. The linear DNA fragment containing the mutation was ligated into circular DNA and the mutant proteins were expressed and purified as described previously[20].

After the proteins had been applied to the first two columns, ammonium sulfate was added to the eluate to a final concentration of 2 M, and the solution was loaded onto a DEAE Sepharose FF column (GE Healthcare). Fd was eluted with a negative linear gradient of 2-0 M ammonium sulfate and the purity was confirmed by native polyacrylamide gel electrophoresis. The Fd concentration was estimated on the basis of its absorption at 420 nm, using an extinction coefficient of 9.68 mM^{-1} cm^{-1} [18].

For the measurement of protein thermal stability, Fd samples were assayed for cytochrome *c* reductase electron transfer activity[13,20]. Fd samples were incubated at each temperature (ranging between 20°C and 80°C) for 30 min. Continuously, the incubated Fd samples were added to an assay mixture that consisted of 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 250 μM NADPH, 39 μM bovine heart cytochrome *c*, and 3.3 U/mL SoFd-NADP reductase. Immediately thereafter, cytochrome *c* reduction was monitored spectrophotometrically at 550 nm at 25°C. The temperature midpoint of the remaining electron transfer activity of Fd was calculated by fitting with the Boltzmann function.

The hydrophobic core of Fd is located in the inner space of the β-grasp motif, which is formed by five β-strands and one α-helix (Fig. 1). In addition, there is a hydrophobic interaction between the side chains on the surface of CmFd, *i.e.*, V53 on β3 and V87 on β5 (Fig. 1).

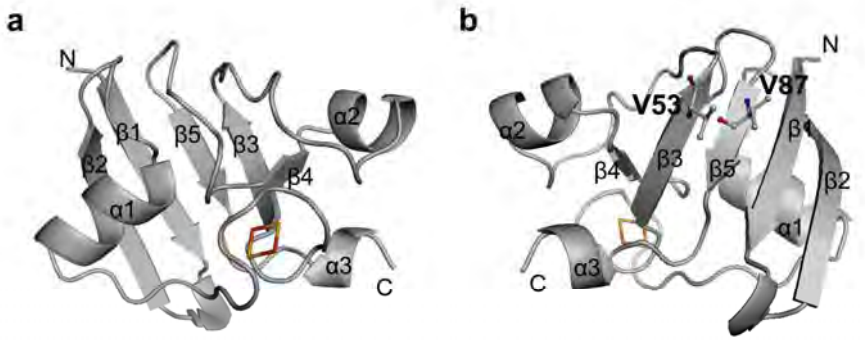

Fig. 1. Crystal structure of CmFd WT
(a) The [2Fe-2S] cluster is shown in stick representation. Fe and S atoms are orange and yellow, respectively. "N" and "C" stand for N-terminal and C-terminal end, and the secondary structure elements are represented. Five β-strands, β1–β5, and an α-helix, α1, form the β-grasp motif, and the hydrophobic core exists in the interior of this motif.
(b) (a) viewed from a different angle. V53 and V87, shown in stick representation, located on β3 and β5, respectively. The side chains are exposed to the surface of the molecule.

Thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus* Fd (MlFd; optimum activity at 65°C[6]) also has hydrophobic residues at this position, but SoFd has K52 and T86 at the corresponding site. Therefore, we designed a point mutation in CmFd that replaces V87 with Ala and assayed protein thermal stability by measuring Fd electron transfer activity. The midpoint temperature of the remaining activity of V87A was 61°C, which was largely decreased compared to 71°C of the CmFd (Fig. 2). This result may indicate that the hydrophobic interaction in this region is indeed important for protein thermal stability. With regard to the V87T mutant (amino acid substitution corresponding to SoFd), the midpoint temperature was 67°C, which is not as low as that of V87A, but still showed a decrease in protein stability. With regard to the V53K mutant, in which an amino acid was substituted that was holding a hydrophobic interaction with V87 and corresponded to SoFd, the midpoint temperature was 66°C. The double mutant V53K/V87T, in which both V53 and V87 were replaced with residues corresponding to SoFd, had a midpoint temperature of 67°C.

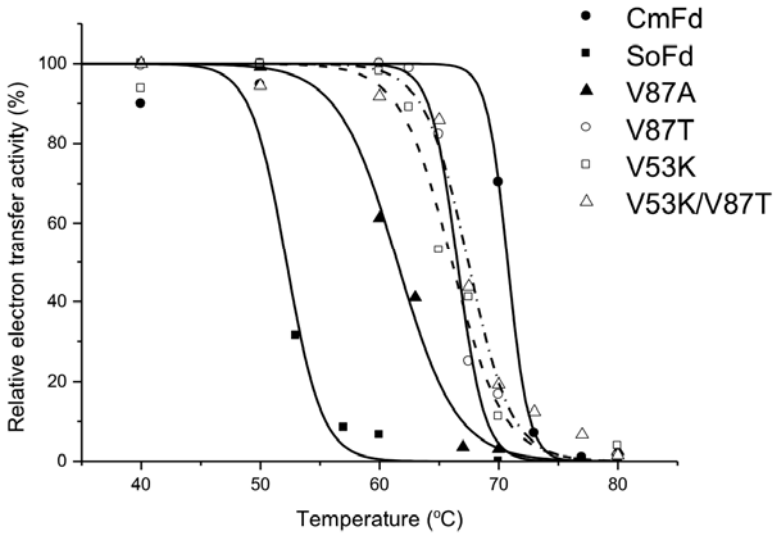

Fig. 2. Measurement of Fds thermal stability
Electron transfer activity of Fd remain after the incubation with indicated temperature was monitored in Fd-$NADP^+$ reductase system by absorption at 550 nm for reduction of cytochrome *c*. Symbols represent, CmFd WT; closed circles, SoFd; closed squares, CmFd V87A mutant; closed triangles, CmFd V87T mutant; open circles, CmFd V53K mutant; open squares, CmFd V53K/V87T double mutant; open triangles. Lines represent fitting with the Boltzmann function.

Comparison of the tertiary structure of CmFd and SoFd showed that CmFd has a specific hydrophobic region formed by V53 and V87 and -CH_2- from K51, L54, and Q89 (Fig. 3). On the other hand, SoFd does not have hydrophobic residues but has an ion pair between K52 and E88 (corresponds to V53 and Q89 in CmFd, respectively) instead in this region. It is generally assumed that close packing of the hydrophobic core and minimized cavities play a major role in protein stability[3,5,12], while amino acid substitution on the surface of the molecular has little effect on its stability[10,17]. Yet, exceptions for these general rules have been reported by demonstrating the few point mutations at the surface resulted in a sufficient increase in protein stability[15,16,19]. Since both CmFd and SoFd have a hydrophobic core under the β-sheet containing these two β-strands, a hydrophobic shield on this region may be important for the structure and thermal stability of Fd. Indeed, MlFd has this hydrophobic shield at this region, too.

Among all 4 mutants, the decrease in thermal stability was the highest for the V87A mutant. It is most favorable to think that this was caused by a loss in the volume of the hydrophobic group. The loss of the methyl group might create a hole in the hydrophobic shield, and thereby destabilized this region. MlFd, which has higher thermal stability, has Ile instead of Val in this region (Fig. 3). A closer packed hydrophobic shield may enable higher protein stability. In contrast, among 3 mutants in which the residues were replaced according to the one in SoFd, V87T, V53K, and V53K/V87T, there was no remarkable difference in their thermal stability. This result indicated the importance of "inter β-strands" action of hydrophobic residues. Furthermore, it indicated that

substitution of one amino acid had the same effect as that of two with regard to hydrophobic interactions. However, these 3 mutants, in which Val was substituted with Lys and Thr, did not lose its thermal stability as did in the case of V87A. This might be due to the volume of the hydrophobic -CH_2- parts in Thr and especially Lys[4]. These methylene groups covered the lack in the hydrophobic shield and, as a result, the mutants did not lose their thermal stability as did the substitution to Ala.

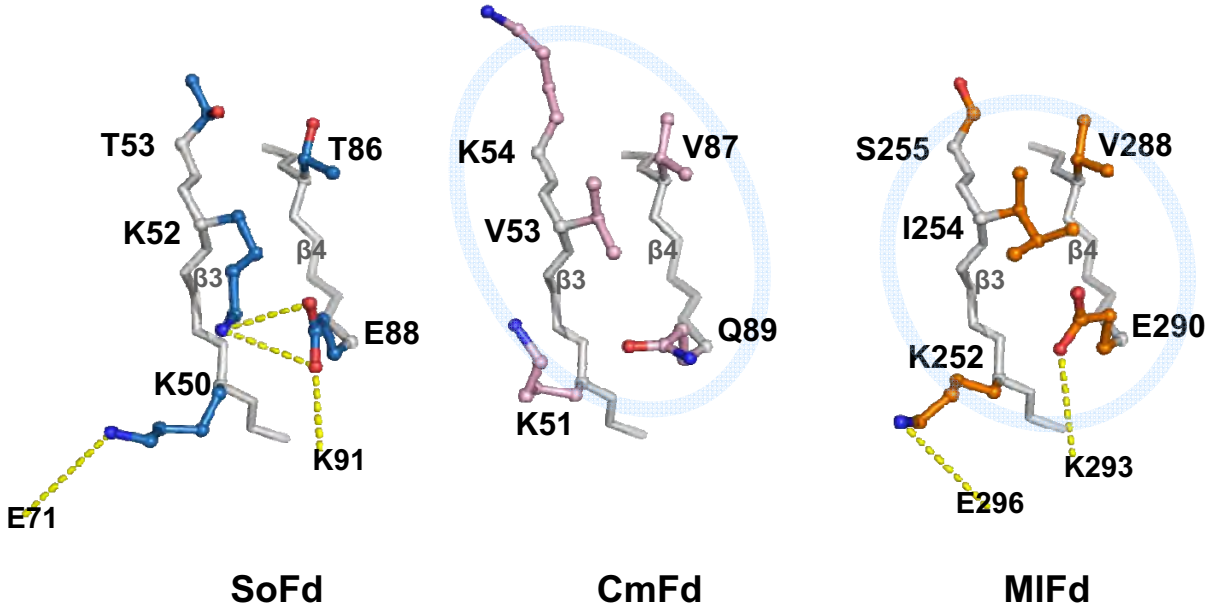

Fig. 3. Surface region of β3 and β5 in 3 different Fds
Five residues that face the surface of the molecule in the β3 and β5 regions from SoFd (blue), CmFd (pink), MlFd (orange) are shown in ball and stick representation. Yellow dashed lines represent the ion pairs. The light-blue circle represents the hydrophobic region. CmFd and MlFd both have a hydrophobic region that shields the β sheet. SoFd does not have hydrophobic residues, but has an ion pair instead.

SoFd does not possess the hydrophobic shield but instead has an ion pair in this region. Since ion pairs have relatively high binding energy, it may be generally thought that this could contribute more to the enhancement of protein stability. Nevertheless, CmFd and MlFd, which have hydrophobic residues in this surface β-sheet region, had higher thermal stability. Additionally, one amino acid substitution in this region can decrease its protein stability by 10°C compared to the CmFd. This demonstrates that shielding the β-sheets from solvents (in many cases water) by hydrophobic residues is more important than to connect the two β-sheets with a strong bond. Placing the hydrophobic shield on the surface of β-strands presumably enabled the proteins to obtain a higher thermal stability by preventing an invasion of water molecules into the core of the protein. However, increasing the thermal stability of mesophilic ferredoxin by introducing a hydrophobic shield should be examined to confirm the hypothesis. The examples of hydrophobic shields protecting the β-sheet structure against water molecules were also reported for thermophilic proteases and cold shock proteins[7,16]. In addition, in CmFd, the existence of a hydrophobic shield on the surface of the β-sheet in the β-grasp motif represents the importance of this region and may be the key point for investigating strategies for protein thermal stability. We are further performing structure-based analyses of CmFd and its mutants and investigating its mechanism of thermal stability.

References

1) Binda, C., Coda, A., Aliverti, A., Zanetti, G., Mattevi, A. 1998. Structure of the mutant E92K of [2Fe-2S] ferredoxin I from *Spinacia oleracea* at 1.7

Å resolution. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 54: 1353–1358.

2) Burroughs, A. M., Balaji, S., Iyer, L. M., Aravind, L. 2007. Small but versatile: the extraordinary functional and structural diversity of the beta-grasp fold. Biol Direct 2: 18.

3) Chen, J. and Stites, W. E. 2001. Packing is a key selection factor in the evolution of protein hydrophobic cores. Biochemistry. 40: 15280–15289.

4) Dyson, H. J., Wright, P. E., Scheraga, H. A. 2006. The role of hydrophobic interactions in initiation and propagation of protein folding. Proc Natl Acad Sci USA. 103: 13057–13061.

5) Eriksson, A. E., Baase, W. A., Zhang, X. J., Heinz, D. W., Blaber, M., Baldwin, E. P., Matthews, B. W. 1992. Response of a protein structure to cavity-creating mutations and its relation to the hydrophobic effect. Science. 255: 178–183.

6) Fish, A., Danieli, T., Ohad, I., Nechushtai, R., Livnah, O. 2005. Structural basis for the thermostability of ferredoxin from the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. J Mol Biol. 350: 599–608.

7) Frigerio, F., Margarit, I., Nogarotto, R., de Filippis, V., Grandi, G. 1996. Cumulative stabilizing effects of hydrophobic interactions on the surface of the neutral protease from Bacillus subtilis. Protein Eng. 9: 439–445.

8) Fukuyama, K., Ueki, N., Nakamura, H., Tsukihara, T., Matsubara, H. 1995. Tertiary structure of [2Fe-2S] ferredoxin from *Spirulina platensis* refined at 2.5 Å resolution: structural comparisons of plant-type ferredoxins and an electrostatic potential analysis. J Biochem 117: 1017–1023.

9) Hanke, G. T., Kimata-Ariga, Y., Taniguchi, I., Hase, T. 2004. A post genomic characterization of Arabidopsis ferredoxins. Plant. Physiol. 134: 255–264.

10) Hecht, M. H., Nelson, H. C., Sauer, R. T. 1983. Mutations in lambda repressor's amino-terminal domain: implications for protein stability and DNA binding. Proc Natl Acad Sci USA. 80: 2676–2780.

11) Matsuzaki, M., Misumi, O., Shin-I, T., Maruyama, S., Takahara, M., Miyagishima, S. Y., Mori, T., Nishida, K., Yagisawa, F., Nishida, K., Yoshida, Y., Nishimura, Y., Nakao, S., Kobayashi, T., Momoyama, Y., Higashiyama, T., Minoda, A., Sano, M., Nomoto, H., Oishi, K., Hayashi, H., Ohta, F., Nishizaka, S., Haga, S., Miura, S., Morishita, T., Kabeya, Y., Terasawa, K., Suzuki, Y., Ishii, Y., Asakawa, S., Takano, H., Ohta, N., Kuroiwa, H., Tanaka, K., Shimizu, N., Sugano, S., Sato, N., Nozaki, H., Ogasawara, N., Kohara, Y., Kuroiwa, T. 2004. Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. Nature. 428: 653–657.

12) Munson, M., Balasubramanian, S., Fleming, K. G., Nagi, A. D., O'Brien, R., Sturtevant, J. M., Regan, L. 1996. What makes a protein a protein? Hydrophobic core designs that specify stability and structural properties. Protein Sci. 5: 1584–1593.

13) Onda, Y., Matsumura. T., Kimata-Ariga, Y., Sakakibara, H., Sugiyama, T., Hase, T. 2000. Differential interaction of maize root ferredoxin:NADP(+) oxidoreductase with photosynthetic and non-photosynthetic ferredoxin isoproteins. Plant Physiol. 123: 1037–1045.

14) Overington, J. P. 1992. Comparison of three-dimensional structures of homologous proteins. Curr Opin Struct Biol. 2: 394–401.

15) Pakula, A. A., Sauer, R. T. 1990. Reverse hydrophobic effects relieved by amino-acid substitutions at a protein surface. Nature. 344: 363–364.

16) Perl, D., Mueller, U., Heinemann, U., Schmid, F. X. 2000. Two exposed amino acid residues confer thermostability on a cold shock protein. Nat Struct Biol. 7: 380–383.

17) Reidhaar-Olson, J. F., Sauer, R. T. 1990. Functionally acceptable substitutions in two alpha-helical regions of lambda repressor. Proteins. 7: 306–316.

18) Tagawa, K. and Arnon, D. I. 1968. Oxidation-reduction potentials and stoichiometry of electron transfer in ferredoxins. Biochim Biophys Acta. 153: 602–613.

19) Van den Burg, B., Dijkstra, B. W., Vriend, G., Van der Vinne, B., Venema, G., Eijsink, V. G. 1994. Protein stabilization by hydrophobic interactions at the surface. Eur J Biochem. 220: 981–985.

20) Yamaoka, A., Ozawa, Y., Ueno, Y., Endo, T., Morimoto, Y., Urushiyama, A., Ohmori, D., Imai, T. 2011. *Cyanidioschyzon merolae* ferredoxin: a high resolution crystal structure analysis and its thermal stability. FEBS Lett. 585: 1299–1302.

MINI REVIEW

Journal of Japanese Society for Extremophiles (2012) Vol.11, 64-69

Tsuda S.[a,b]

Antifreeze proteins from Japanese fish

国産魚類由来の不凍タンパク質

産業技術総合研究所生物プロセス研究部門
北海道大学生命科学院
津田 栄

[a]Bioproduction Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 2-17-2-1 Tsukisamu-Higashi, Toyohira-ku, Sapporo 062-8517, JAPAN.
[b]Graduate school of life science, Hokkaido University

Corresponding author: Sakae Tsuda, s.tsuda@aist.go.jp
Phone: +81-11-857-8912, Fax: +81-11-857-8983

Received: October 26, 2012 / Accepted: November 16, 2012

Abstract Antifreeze protein (AFP) is an extraordinary bio-molecule that specifically binds to the surface of an ice crystal to inhibit its growth below 0 C, and also to the membrane surface of a cell to improve its viability above 0 C. Based on our knowledge about the biochemical/biophysical properties as well as the structure-function relationships of various AFPs, we are trying to develop new AFP-technologies applicable from industry to medical fields.

Keywords: antifreeze protein, ice-binding, ice recrystallization inhibition, three-dimensional structure.
キーワード: 不凍蛋白質、氷結晶結合、再結晶阻害、３次元構造

要約
不凍タンパク質（AFP）は、凍結する直前の水の内部に無数に生成する氷の単結晶（=氷核）に対して特異的に結合する機能（氷結晶結合機能）を有する。さらに、魚類由来の AFP は氷のみならず脂質二重膜にも強く結合してその細胞の寿命を延ばす機能（細胞保護機能）を発揮する。著者らは、これまでに大量生産が可能になった魚類由来 AFP を活用することで新たな技術を作りたいと考えている。

はじめに

これまでに、不凍タンパク質（Antifreeze Protein: AFP、不凍糖蛋白質 AFGP を含む）は魚類のみならず昆虫、植物、菌類などからも発見され、それらは 10 種類以上の異なるタイプに大別されている。それらの AFP は各々の祖先蛋白質が独立に分子進化を遂げて氷結晶結合能力を獲得するに至ったと考えられており、祖先蛋白質の幾つかは既に特定されている。すなわち、個々の AFP の間ではアミノ酸配列、分子量、３次元分子構造、氷結晶結合部位、熱安定性、不凍活性(熱ヒステリシス)等が極めて大きく異なっている [2,6]。このため、AFP の実用化を考える際には、数ある AFP の中でどの種類が何の用途に使えるのかを精査し、さらに注目する AFP が安価に大量生産できるか否かを明らかにする事が非常に重要になる。氷結晶結合機能と細胞膜保護機能を併せ持つ魚類由来の AFP（図１）は、水産資源大国・日本の特徴を生かす有用機能性物質の一つになっていく可能性がある。

魚類由来 AFP の種類

AFGP は、今から約 40 年前に南極海に生息するノトセニア科魚類の血液から見出された初めての AFP である。この分子は Ala-Ala-Thr の 3 残基を単位とした反復配列から構成され、以下のような分子量の異なる８個のアイソフォームとして魚体内に発現されている：AFGP1（34 kDa）、AFGP2（29 kDa）、AFGP3（21.5 kDa）、AFGP4（17 kDa）、AFGP5（10.5 kDa）、

AFGP6（7.9 kDa）、AFGP7（3.8 kDa）、AFGP8（2.6 kDa）[15]。Thr の側鎖の-OH 基に結合している 2 糖(ガラクトシル-N アセ チルガラクトサミン)が不凍活性に必須とされている。AFGP は極めて高い熱安定性を有しており、90-95°C の熱処理後においても不凍活性の低下がほとんどない。化学合成によって調製した AFGP の反復単位の構造が NMR 法によって解析され [16]、その骨格構造は II 型のポリプロリン構造に類似した 3 残基ごとに一周する左巻きヘリックス構造であることが明らかになった。糖鎖が結合している Thr 残基はヘリックスの片側に直線状に配置されており、糖鎖にある水酸基の多くはヘリックスに平行に並んでいた。これらの立体構造上の特徴が氷結晶との相互作用が AFGP の不凍活性をもたらすと考えられている。

AFPI は、南極海ではなく北大西洋の北部沿岸に生息するフユヒラメの血液から糖鎖修飾を受けていない初めての AFP として発見された [1]。AFPI は、アラニンが構成アミノ酸の 6 割以上を占める単鎖ポリペプチドであり、Thr-Ala-Ala-X-Ala-X-X-Ala-Ala-X-X(X は任意) からなる 11 残基のモチーフの 3〜6 回の繰り返しから構成される。すなわち AFPI の天然物もアミノ酸組成と鎖長の異なる複数のアイソフォームの混合物であるが、その分子量分布は 3〜4.5 kDa と非常に狭い範囲にある。このため、AFGP に比べると遙かに容易に“アイソフォーム混合物”としての AFPI 天然物を高純度に精製することができる。ある特定の AFPI アイソフォームについて解かれた X 線構造は、長さ約 55Åの 1 本鎖α-らせんであった。このらせんは 3.6 残基で 1 回転するため(1 残基あたり 100°回転)、11 残基では 1,100 度すなわち約 3 回転する。この構造の特徴がモチーフ内の各アミノ酸をらせん軸に対して平行かつ等間隔に配置させている。11 残基毎にある Thr 残基同士の距離は 16.7Åであり、ピラミダル面と呼ばれる氷結晶表面を構成する水分子の間隔(16.5Å)とほぼ等しい。このため、初めは AFPI の Thr 残基の OH 基が同分子を氷結晶に結合させる部位であると予測された。その後、Thr 側鎖のメチル基や Ala 側鎖の疎水性が氷結晶面との相互作用に関与することを強く示唆する実験結果が得られたため、AFPI の氷結晶結合メカニズムに関する議論は現在も続いている [5]。

分子量約 13kDa の AFPII は AFGP や AFPI のような繰り返し配列をもたない。同分子中には 10 個の Cys 残基が存在し、そのすべてが分子内 S-S 架橋を形成している。アミノ酸配列、Cys の位置、立体構造に関してカルシウム結合型(C 型)レクチンの一部ドメインとの間に高い相同性がみられる。また、ヒト由来のカルシウム結晶結合蛋白質(リソスタシン)とも相同性を示す。AFPII は不凍活性の発現に カルシウムを必要としないものと必要とするものの２種類に大別される。AFPII 天然物もアイソフォームの混合物ではあるが、その種類は非常に少ない。著者らは北海道のオホーツク海沿岸等に生息するシチロウウオから単離精製されたカルシウム非依存型の II 型 AFP の X 線構造を 2008 年に明らかにした [14]。この分子の中央にはねじれた逆平行β-シートがありその両側にα-らせんが一つずつ配置していた。同 AFPII の変異体作成実験から、AFPII の氷結晶結合部位はβ-シートとその近傍のループ領域であることが示された。この領域は疎水性残基を含む平坦性の高い構造を形成しており、氷結晶表面に対して相補的に結合すると予測された。また、安井らはワカサギ由来の Ca^{2+}非依存型 AFP を対象として、Ca^{2+}結合ループに 存在する Thr へ変異を導入し不凍活性の変化を解析した。その結果、Thr 側鎖の水酸基が氷 結晶への結合に関与していることを報告した [17]。このことは、I 型 AFP や Ca^{2+}非依 存性の II 型 AFP などに予想された AFP の疎水性領域が氷結晶との相互作用について重要であるという知見とは異なっている。このことから、AFPII は C 型レクチンを祖先分子として骨格構造を保持しながら進化し、氷結晶との相互作用様式について多様性を有していると考えられる。

AFPIII は北米の北東部沿岸に生息しているゲンゲ科に属する魚類から見出された [10]。分子量は 6.5〜7kDa であり、アミノ酸組成に偏りがなく繰り返し配列や分子内 SS 架橋も有しない。AFPIII の特徴の１つは１個の魚体の中に数多くの AFPIII アイソフォームが発現されていることである。各アイソフォーム は中性 pH 領域におけるイオン交換樹脂への結合の仕方によって、陰イオン交換樹脂である QAE-Sephadex に結合する QAE タイプ(塩基性側の pI を有する)、陽イオン交換樹脂である SP-Sephadex に結合する SP タイプ(酸性側の pI を有する)に大別される。北海道東部沿岸水域で大量に捕獲されるゲンゲ科魚類から得られる AFPIII の場合、アイソフォームの数は 13 にも上り、それぞれの不凍活性は大きく異なる [12]。AFPIII は 3 本の短いβ-ストランドによって形成される二組の逆平行β-シートを骨格にもつ球状蛋白質であり、これらのβ-シートによって挟まれた分子の中心部は疎水性コアを形成している。1 本のβ-ストランドとその近傍のループによって形成されている平面性の高い分子表面が氷結晶結合部位と予想され、同部位は親水性残基と疎水性残基 の両方を含む。アイソフォーム間で不凍活性が異なることは、それぞれが結合できる氷結晶面の種類と結合の強さが関係していると考えられている。

上記に加えて、1996 年にはカジカの鱗に局在する皮型（スキンタイプ）AFP と呼ばれる種類が報告さ

れ[4]、2004 年には熱安定性には欠けるものの極めて強い不凍活性を示す新しいタイプの魚類 AFP が見出されている[11]。第４のタイプに属する AFP をカジカが有しているとの論文も 1997ー8 年に３報だけ発表されたが、この見解の誤りを指摘した論文が 2008 年に出されている[3]。このように魚類由来の AFP に限っても複数のタイプが見出されており、各々の氷結晶結合機能の解明が待たれている。現時点でアイソフォームまでを含めると百以上の異なる魚類 AFP 分子が存在することになり、どの AFP が有用かつ量産可能であるかを見極めることは容易ではない。新たな魚類 AFP 分子が今後発見される可能性もある。なお、著者らは 2012 年に菌類由来の AFP の３次元分子構造の解明に成功した（図１）[9]。この菌類由来の AFP の可能性については機会を改めて紹介したい。

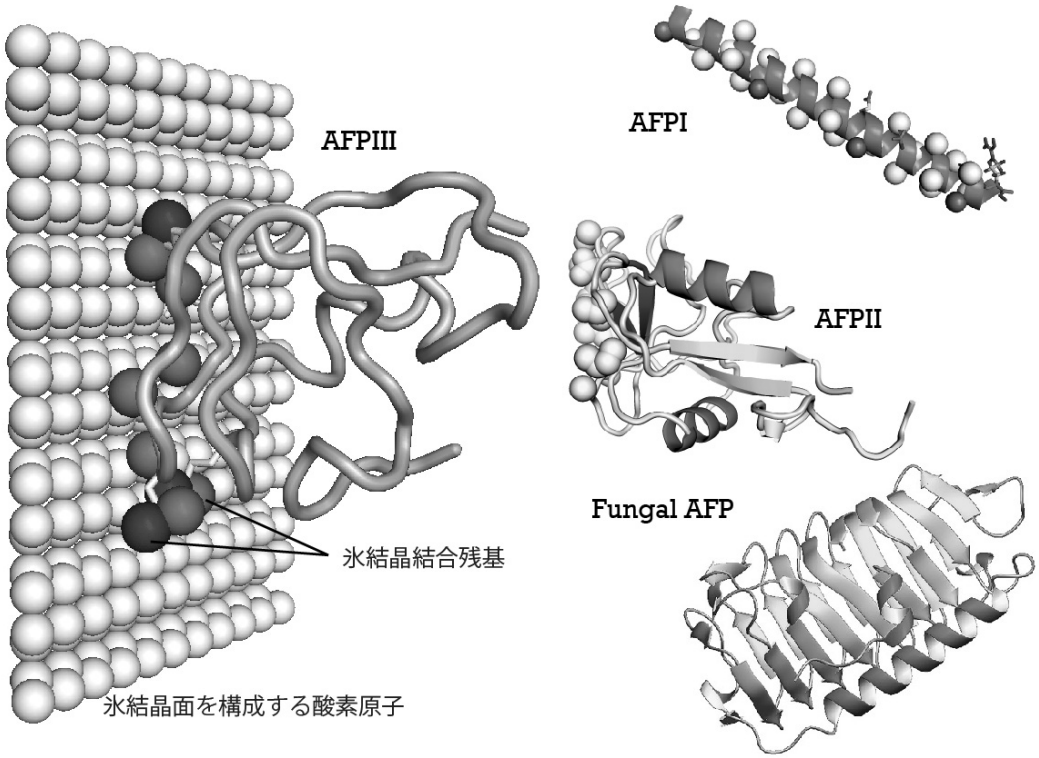

図１． 魚類由来 AFP（AFPIーIII）および菌類由来 AFP（FingalAFP）の主鎖骨格構造のリボンモデル。いずれの AFP も氷結晶面に対して特異的に結合できる分子表面を有している。

魚類由来 AFP の機能

魚類由来の AFP を用いた凍結技術の理解に役立つ簡単な実験例を図２に示す。まず４つの紙コップに色水を 50ml ずつ用意する。次いで、各々に対して魚体から精製した AFP の粉末を 0、0.1、 0.2、0.5mg/ml になるように加える。これらを汎用の冷凍庫（約-20℃）に入れて凍らせた結果が図２の様になる。すなわち、AFP を加えていない氷（左端のコップ）では凍った水が白くなり氷の中央部が白く盛り上がる。氷は無数のツブ氷（氷核）が融合したものであるが、水分子以外の物質はこの融合に参加できない。その結果、色成分は融合するツブ氷から自動的に排除される。排除された色成分は未凍結の部分すなわち紙コップの中央付近に濃縮される。こうして色が抜けた氷が白く見える。また、水が氷に変化する際の体積膨張が中央部を盛り上げる。一方、AFP を添加した色水を凍結させた場合には、AFP 濃度を 0.1 から 0.5mg/ml まで増加させるに従い白っぽさが消え、氷の盛り上がりも抑えられることが分かる。すなわち AFP を添加した色水では全体が鮮やかに着色されたまま凍結する。これは、AFP が個々のツブ氷に結合しそれらの表面を覆い、それら同士の融合を阻止する結果として、色成分を排除する力や体積膨張を抑える為と推察される。このような AFP の働きは「再結晶化阻害機能 (Recrystallization Inhibition)」と呼ばれることもある。昆虫、植物、菌類由来の AFP についても活性の強さに違いはあるけれども氷の再結晶化阻害機能が認められている。しかし、氷結晶を特別な六方両錘型や針状結晶にまで成形した状態で再結晶阻害機能を発揮できるのは、今のところ魚類 AFP だけである。このように AFP は凍結状態にある含水物の内部をツブ氷で満たす働

きをする。これを応用することで、加工食品、スープ類、氷菓子類、めん類、パン類、野菜、果実、種子、清涼飲料水、酒類、医療品、化粧品、インク顔料、高分子ゲル等の内部をツブ氷で満たす新しい凍結保存技術を開発できると考えられる[13]。

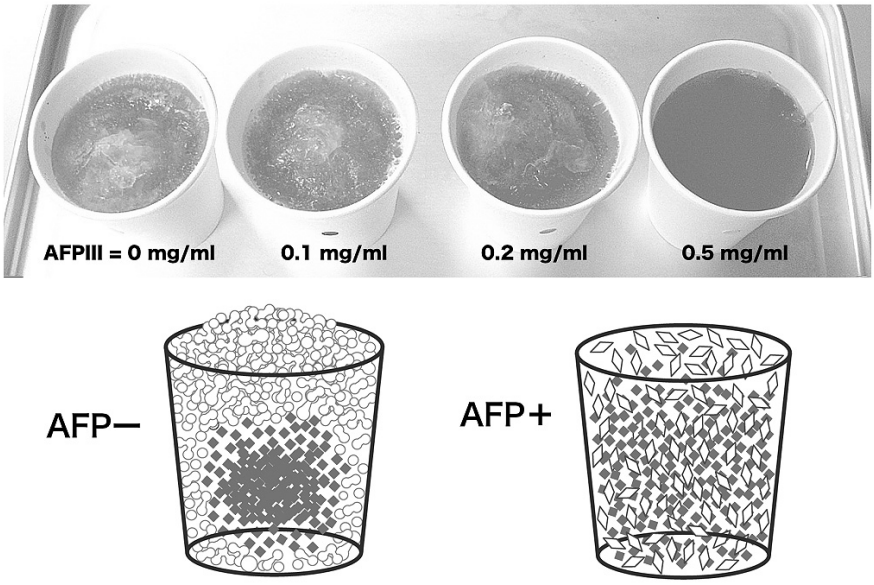

図２．AFP の凍結濃縮抑制効果を示す実験の例。上段： AFPIII の濃度が 0、0.1、0.2、0.5mg/ml になるように調製した着色水を−18℃で一晩凍結させた後の氷の画像。下段：通常の水溶液を凍らせたときに起こる溶質の凍結濃縮現象の模式図（左）。AFP を添加すると氷のツブと溶質成分の混合状態となり凍結濃縮現象が抑制される。

魚類由来 AFP の細胞保護機能を直感的に理解するための実験結果を図３に示す。これらは共焦点レーザー顕微鏡を用いて撮影した AFP またはウシ血清アルブミン（BSA）存在下における１個のヒト肝臓由来細胞（HepG2）の画像である。試料温度は 30℃であり、非凍結状態での観察結果であることに注意されたい。AFP と BSA にはそれぞれ蛍光物質を結合させている。図３A は AFP 存在下での同顕微鏡スライス画像であり、細胞表面の脂質二重膜付近がまんべんなく光っていることが判別できる。位置を変えて撮影した 16 枚のスライス画像から合成した細胞全体のイメージ（図３ｃ）においても AFP の細胞膜への吸着が確認できる。一方、同条件で撮影した BSA 存在下における HepG2 の画像では、BSA もいくぶん脂質二重膜付近に吸着してはいるものの、その密度は AFP のそれに比べて著しく低い。すなわち魚類由来の AFP はマイナスの温度域では氷結晶に結合し、プラスの温度域においては細胞膜に結合する機能を有している。著者らは、プラス 4℃の非凍結温度域において、AFP が HepG2 細胞の生存率を飛躍的に高めることを明らかにした[7]。更に、電気化学的実験の結果を基にして HepG2 細胞は時間経過とともに膨張して破裂死に至るが、AFP の細胞表面吸着がその膨張を抑制することによって HepG2 の破裂死を遅らせるのではないか？と推察した[8]。この細胞保護効果は十種類以上の細胞について確認されており、新しい細胞膜保護剤としての AFP の活用も期待される。

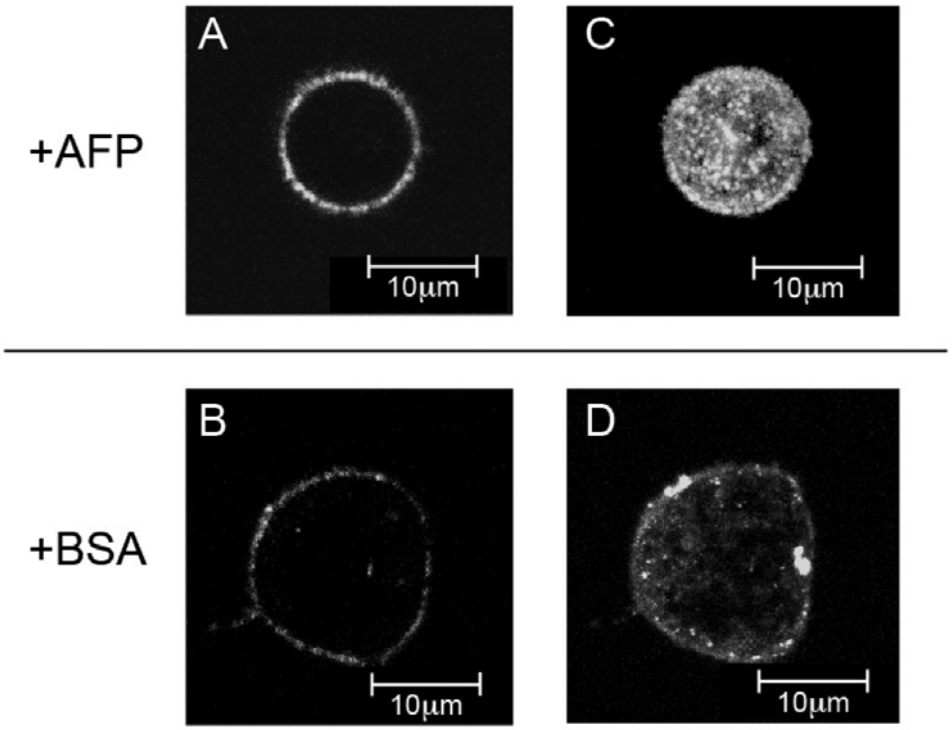

図３． AFP またはウシ血清アルブミン（BSA）存在下におけるヒト肝臓由来細胞（HepG2）の共焦点レーザー顕微鏡画像。各タンパク質には蛍光ラベルを施している。上段：（A）蛍光ラベル AFP の細胞膜吸着を示す顕微鏡スライス画像、（C）同スライス画像を重ねて合成した細胞全体を表す画像。下段：（B、D）蛍光ラベル BSA が HepG2 細胞に結合する様子を表す画像。

魚類由来 AFP の活用技術と今後の展望

AFP の氷結晶結合機能は共雑物の存在下でも十分に発揮される。糖類、塩、グリセロール、小分子量ペプチドなどは AFP の不凍機能を高める働きをする。AFPI はエタノール存在下でも氷結晶結合機能を失わない事が予備的実験から示されている。もともと AFP が含まれている動植物の体液中には数多くの物質が混在しており、AFP は共雑物の影響を受けにくいように出来ているのかも知れない。すなわち、技術応用にとって必ずしも AFP の高純度品は必要ではない。例えば冷蓄熱や食品などの分野では AFP の天然物あるいは遺伝子組換え物の粗精製品を使うことができる。実際に、ユニリバー社は特定の AFPIII アイソフォームの遺伝子組換え物の粗精製品を添加したアイスクリームを販売している。すなわち AFP がもつ氷の再結晶化阻害機能を利用することでアイスクリーム中に生成した氷結晶の粒径を小さく保たせることに成功している。従来、アイスクリーム内の氷の粒径は多量の乳脂肪分を加えることで小さくしてきたが、代わりに AFP を加えることで乳脂肪分を減らすことが出来るとされる。また、凍結めん類等に添加した場合にその食感や品質が改善されることが分かっている。

魚類由来 AFP は、以下の優れた特徴を備えている：１）粗精製品としても高純度品としても生産可能（天然物）、２）氷結晶を六方両錘型や針状などの特定の形状に成形できる（注．AFPIーIII および AFGP）、３）他の AFP よりも分子サイズが非常に小さい（注．AFPI と AFPIII）、４）水溶性が極めて高い（注．AFPI と AFGP）、５）水に溶解した後の耐熱性と耐久性に優れている（注．AFPI と AFGP）、６）細胞保護効果を発揮する（注．AFPI、AFPIII および AFGP）。従って、魚類 AFP はアイスクリームや凍結めん類のみならず、医学的分野を含むより広範かつ精密な用途に対しても応用が可能である。液体窒素や特別な装置を必要としない省エネルギー性を有していることが特に魚類 AFP 技術が有する大きな特徴である。日本は世界第６１位の国土面積を擁す小さな国だが、排他的経済水域（領海を含む）の広さでは世界第６位になる。魚類 AFP はこの広大な水域で捕獲される魚類から無尽蔵に大量生産することが原理的には可能と言える。今後も基礎と応用

の両面から魚類 AFP の研究開発を押し進め日本の特徴を生かすような新技術を創って行きたい。

文献

1) Duman, J.G. and DeVries, A.L. 1976. Isolation, characterization, and physical properties of antifreeze protein from the winter flounder, Pseudopleuronectes americanus. Com. Biochem. Physiol. 54B: 375-380.
2) Fletcher, G.L., Hew, C.L., and Davies, P.L. 2001. Antifreeze proteins of teleost fishes. Annu. Rev. Physiol. 63: 359-390.
3) Gauthier, S.Y., Scotter, A. J., Lin, F -H., Baardsnes, J., Fletcher, G. L., and Davies, P. L. 2008. A re-evaluation of the role of type IV antifreeze protein. Cryobiology 57: 292-296.
4) Gong, Z., Ewart, K. V., Hu, Z., Fletcher, G. L., and Hew, C. L. 1996. Skin Antifreeze Protein Genes of the Winter Flounder, Pleuronectes americanus, Encode Distinct and Active Polypeptides without the Secretory Signal and Prosequences. J. Biol. Chem. 271: 4106-4112.
5) Graether, S. P., and Sykes, B. D. 2004. Cold survical in freeze-intolerant insects: the structure and function of β-helical antifreeze proteins.1 Eur. J. Biochem. 271: 3285-3296.
6) Griffith, M. and Ewart, V. 1995. Antifreeze proteins and their potential use in frozen foods. Biotechnol. Adv. 13 (3): 375-402.
7) Hirano, Y., Nishimiya, Y., Matsumoto, S., Matsushita, M., Todo, S., Miura, A., Komatsu, Y., and Tsuda, S. 2008. Hypothermic preservation effect on mammalian cells of type III antifreeze proteins from notched-fin eelpout. Cryobiology 57: 46-51.
8) Hirano, Y., Nishimiya, Y., Kowata, K., Mizutani, F., Tsuda, S., and Komatsu, Y. 2008. Construction of Time-Lapse Scanning Electrochemical Microscopy with Temperature Control and Its Application to Evaluate the Preservation Effects of Antifreeze Proteins on Living Cells. Anal. Chem. 80: 9349-9354.
9) Kondo, H., Hanada, Y., Hoshino, T., Garnham, C.P., Davies, P.L., and Tsuda, S. 2012. Ice-binding site of snow mold fungus antifreeze protein deviates from structural regularity and high conservation. Proc. Natl. Acad. Sci. 109: 9360-9365.
10) Li, X., Trinh. K., and Hew, C.L. 1985. Structure of an antifreeze polypeptide and its precursor from the ocean pout, Macrozoarces americanus. J. Biol. Chem. 260: 12904-12909.
11) Marshall, C. B., Fletcher, G. L., and Davies, P. L. 2004. Hyperactive antifreeze protein in a fish. Natrure 429: 153.
12) Nishimiya, Y., Sato, R., Takamichi, M., Miura, A., and Tsuda, S. 2005. Co-operative effect of the isoforms of type III antifreeze protein expressed in Notched-fin eelpout, Zoarces elongatus Kner. FEBS J. 272: 482-492.
13) Nishimiya, Y., Mie, Y., Hirano, Y., Kondo, H., Miura, A., and Tsuda, S. 2008. Mass preparation and technological development of an antifreeze protein - Toward a practical use of biomolecules - Synthesiology 1: 7-14.
14) Nishimiya, Y., Kondo, H., Takamichi, M., Sugimoto, H., Suzuki, M., Miura, A., and Tsuda, S. 2008. Crystal Structure and Mutational Analysis of Ca^{2+}-Independent Type II Antifreeze Protein from Longsnout Poacher, Brachyopsis rostratus. J. Mol. Biol. 382: 734-746.
15) Raymond, J. A., and DeVries, A. L. 1972. Freezing Behavior of Fish Blood Glycoproteins with Antifreeze Properties. Cryobiology 9: 541-547.
16) Tachibana, Y., Fletcher, G., Fujitani, N., Tsuda, S., Monde, K., and Nishimura S.-I. 2004. Antifreeze glycoproteins: Elucidation of the structural motifs that are essential for antifreeze activity. Angew. Chem. Int. Ed. 43, 856-862.
17) Yasui, M., Takamishi, M., Miura, A., Nishimiya, Y., Kondo, H., and Tsuda S. 2008. Hydroxyl groups of threonines contribute to the activity of Ca^{2+}-depdendent type II antifreeze protein. Cryobio. Cryotech. 54: 1-8.

MINI REVIEW

Journal of Japanese Society for Extremophiles (2012) Vol.11, 70-74

Fujisawa M.[a,b]

Isolation of alkaliphiles, which can grow by oxidative phosphorylation under high lithium ion concentration instead of sodium ion and its physiology, predicted from comparative genome analysis with sodium dependent ones.

高濃度のリチウムイオン存在下で酸化的リン酸化によって生育する好アルカリ性細菌の単離とゲノムから予測される生理的性質

東洋大学　生命科学部　食環境科学科
東洋大学バイオ・ナノエレクトロニクス研究センター
藤澤 誠

[a]Faculty of Food Life Sciences, Toyo University, 1-1-1 Izumino, Itakura-machi, Oura-gun, Gunma, 374-0193, JAPAN
[b]Bio-Nano Electronics Research Center, 2100 Kujirai, Kawagoe, Saitama, 350-8585, JAPAN

Correspondence author: Makoto Fujisawa, m_fujisawa@toyo.jp
Tel: +81-276-82-9025 Fax: +81-276-82-9025

Received: October 27, 2012 / Accepted: November 6, 2012

Abstract Alkaliphilic bacterial organisms have an optimal growth pH above 9.0[6]. They can maintain the cytoplasmic pH close to neutral pH under such high pH condition. In general, sodium transport cycles are coupled to the cytoplasm acidification. *Bacillus pseudofirmus* OF4, an exclusively studied facultative alkaliphile whose genome has been sequenced[8], can grow on malate by oxidative phosphorylation and it requires sodium ion at more than 10 mM at pH 10.5[9]. However, some of alkaliphiles such as *Bacillus foraminis* CV53T are assumed to be independent on sodium ion[10]. In addition, contribution of intracellular acid production to it has been suggested from the fact that *B. pseudofirmus* OF4 could maintain the intracellular pH at 9.2 on glucose without sodium when the cells were upshifted from pH 8.5 to 10.5[9]. Exploring alkaliphilic bacteria, which grows by oxidative phosphorylation and requires much lower sodium would be one of the challenges to find a novel alkaline environment adaptation.

Keywords: alkaliphiles, *Bacillus*, genome, ion transporters, cell surface
キーワード: 好アルカリ性細菌、バチルス、ゲノム、イオン輸送体、細胞表層

はじめに

pH 9.0 以上という高いアルカリ環境下で至適生育を示す好アルカリ性細菌は、生物はどのようにアルカリ環境に適応するのか、また生物が生存しうる pH の上限はどの程度なのかといった根本的な問題や、アルカリ環境下で機能的に働く酵素を産生するという点で興味深い研究対象である。好アルカリ性細菌の特徴の一つとして、プロトン(H^+)の少ない環境下で生育するためにナトリウムイオン(Na^+)を利用することが挙げられる[1, 6, 9]。一般に、好アルカリ性細菌は細胞内 pH を中性付近に保っており、これが細胞内外への Na^+の循環系と共役している。つまり、Na チャネル、Na^+駆動型べん毛モーター、Na^+/アミノ酸共輸送体などによって細胞内により取り込まれた Na^+が、Na^+/H^+アンチポーターによって排出される際に H^+が取り込まれ、細胞内が酸性化される。一方、*Bacillus foraminis* CV53T のように生育に Na^+を必要としないものも見つかっており[10]、このような生物では、おそらくカリウムイオン(K^+)など別のイオンを利用した細胞内酸性化機構が存在すると考えられている[9]。好アルカリ性細菌のこの特徴から考えると、Na^+や K^+以外の様々な陽イオンを巧みに利用し、細胞内を酸性化することのできる好アルカリ性細菌が存在していてもおかしくはない。我々は、この性質を活用することで、好アルカリ性細菌の新

規アルカリ環境適応機構の発見・解明と新たな応用分野の開発を目指している。具体的には、Na^+の代わりにレアメタルであるリチウムイオン(Li^+)を加えた培地を作成し、Na^+に依存しない、または依存性が低い好アルカリ性細菌の単離を試みた。そして、分離株中の 1 菌株については、ドラフトゲノムを解読し、既存の Na^+依存型の好アルカリ性細菌のゲノムと比較を行うことで、その特徴を抽出した。これにより、Na^+非依存型または低依存型のアルカリ環境適応機構のモデルの構築を目指した。一方で、Li^+の結合タンパク質が見つかれば、レアメタルであるリチウムの回収技術に利用できるし、イオン輸送体中のイオン結合部位やイオン選択部位の知見が得られれば、イオンチャネル病などの治療に必要な知見を得ることが期待できる。

Na^+依存性の好アルカリ性細菌の生育における Li^+の影響

Bacillus pseudofirmus OF4 株は好気性の通性好アルカリ性細菌で、中性付近でも良好な生育を示すため、一般的な中性細菌との比較が行いやすいことや、遺伝子工学的手法を利用可能であることなどから、アルカリ環境適応機構のモデル生物としてよく研究されている。また、本菌は一般的な中性付近で生育する細菌と同様に、低 H^+濃度のアルカリ環境下においてもプロトン駆動力を用いて酸化的リン酸化を行っており、生体エネルギーの研究分野においても重要な役割を果たしている [5]。本菌のゲノムは染色体(3.86 Mb)と大小 2 つのプラスミド(0.29 Mb、0.10 Mb)からなり、2011 年に全塩基配列が解読されている [8]。*B. pseudofirmus* OF4 株は一般的な好アルカリ性細菌と同様に、Na^+に依存した生育を示し、エネルギー源としてリンゴ酸を含んだ pH 10.5 の培地では至適生育に 10 mM 程度の Na^+を必要とする [7]。しかしながら、好アルカリ性細菌の Li^+の要求性については、まったく調べられていなかった。

そこで我々は、はじめに *B. pseudofirmus* OF4 株の生育における Li^+の影響を調べた。緩衝剤として炭酸ナトリウム、エネルギー源としてリンゴ酸ナトリウムを含む半合成培地(MYE 培地)が *B. pseudofirmus* OF4 株の培養によく用いられている。この MYE 培地中の炭酸ナトリウムとリンゴ酸ナトリウムを、炭酸カリウムとリンゴ酸カリウムを用いて調製することで低 Na^+濃度の培地を作成した(KMYE 培地)。この培地に様々な濃度の Na^+または Li^+を添加し、*B. pseudofirmus* OF4 株の生育実験を行った。その結果、*B. pseudofirmus* OF4 株は pH 10.5 においては 10 mM 以上の NaCl を要求するが、300 mM まで LiCl を添加しても生育はしないことが明らかとなった(図 1 を参照)。*B. pseudofirmus* OF4 株は pH 7.5 のとき、pH 10.5 で要求する Na^+濃度よりも高い濃度を要求することが知られている [7]。これは、Na^+/アミノ酸共輸送体などの Na^+駆動力を利用する物質輸送系が H^+による競合阻害を受けるためであると推察されている [9]。そこで、*B. pseudofirmus* OF4 株の生育における LiCl の効果を pH 8.5、9.0、9.5、10.0、10.5 で調べると、pH 10.0 以下で生育が観察された(図 2)。LiCl 濃度が高くなるほど至適生育は低い pH で観察され、200 mM LiCl では pH 9.0 (図 2A)、50 mM LiCl では pH 9.5 (図 2B)、10 mM LiCl では pH 9.5-10.0(図 2C)で至適生育を示した。したがって、Na^+依存型の *B. pseudofirmus* OF4 株は、栄養素の取り込みなどの過程においては Na^+の代わりに Li^+を利用できるが、より高い pH で細胞内を酸性化する際には Li^+をほとんど利用できないか、または Li^+の毒性に対する耐性機構が脆弱であると考えられた。

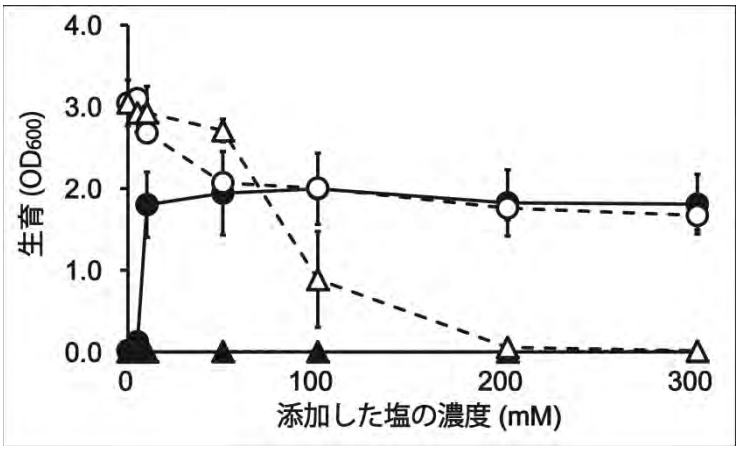

図 1. *B. pseudofirmus* OF4 株と *B. pseudofirmus* KU50 株の生育における NaCl と LiCl の効果
様々な濃度の NaCl または LiCl を加えた pH 10.5 の KMYE 培地中での生育を調べた。*B. pseudofirmus* OF4 株の生育における NaCl の効果(●)と LiCl の効果(▲)、および *B. pseudofirmus* KU50 株の生育における NaCl の効果(○)と LiCl の効果(△)をそれぞれ示した。

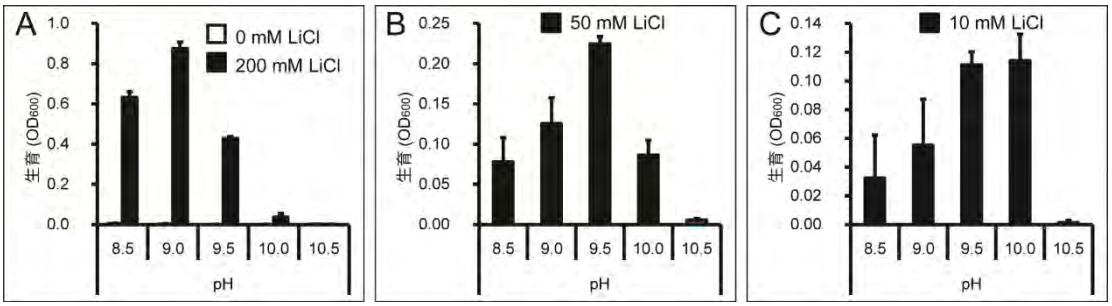

図 2. *B. pseudofirmus* OF4 株の生育における LiCl と pH の効果
B. pseudofirmus OF4 株の KMYE 培地中での生育における LiCl と pH の効果を調べた。200 mM LiCl を加えたとき (A)、50 mM LiCl を加えたとき(B)、10 mM LiCl を加えたとき(C)の生育を様々な pH で調べた。リチウムを添加しなかった時の生育はパネル A のみで示し、B と C では簡略のため省略した。

Na^+非依存性の好アルカリ性細菌の単離と同定

B. pseudofirmus OF4 株の生育実験の結果をもとに、100 mM 以上の LiCl を添加した pH 10.5 の KMYE 培地を新規好アルカリ性細菌の分離培地として用いた。この条件下で生育する好アルカリ性細菌は、①Na^+への依存性が低い、②Li^+などの陽イオンを細胞内の酸性化に利用できる、③Li^+耐性が高いことが予想された。炭素源にグルコースではなく、リンゴ酸を用いた理由としては、嫌気呼吸による有機酸の生成によって細胞内の酸性化が起こると、好アルカリ性細菌の陽イオンへの依存性が低下することが考えられたためである [2)]。微生物の分離源には一般的な土壌や湖沼に加え、アルカリ pH を示す石灰質の土壌、リチウムを含む国内外のリシア雲母や岩塩などを用いた。結果として、これまでに 56 菌株が単離された。これらの細菌から染色体 DNA を調製し、16S rDNA 領域を PCR で増幅後、塩基配列を決定し、相同性検索を行った(表 1)。すべての菌株は好アルカリ性バチルス属細菌と最も高い相同性を示したが、そのうちの 1 菌株が *B. pseudofirmus* OF4 株の塩基配列と 100% 一致していた。KU50 株と命名したこの細菌は、運動性のあるグラム陽性の桿菌で、細胞の端に母細胞が膨らまない胞子形成を行い、カタラーゼ活性とオキシダーゼ活性を示した。これらの性質はすべて *B. pseudofirmus* OF4 株の性質と同じであったことから、KU50 株は *B. pseudofirmus* OF4 株の近縁種であることが推定された。一方で、KU50 株は Na^+と Li^+に対する性質が OF4 株とは大きく異なっていた(図 1)。生育実験の結果から、OF4 株は pH 10.5 において至適生育に 10 mM 以上の NaCl を必要とし、LiCl については 300 mM まで添加しても生育は観察されなかったのに対し、KU50 株は NaCl や LiCl を添加しなくても生育し、LiCl に対しては 100 mM まで耐性があった。この結果は、KU50 株の細胞内の酸性化機構には OF4 株が要求するのと同程度の Na^+や Li^+を必要としないこと、つまり、別の陽イオンを利用するか、まったく別の機構が存在することを示唆した。

表 1. 16S rDNA 塩基配列を用いた分離菌株の同定

最も高い相同性を示した生物種 [a)]	単離された菌株数
Bacillus lehensis	**33 菌株**
Bacillus polygoni	**11 菌株**
Bacillus clausii	**7 菌株**
Bacillus neizhouensis	**3 菌株**
Bacillus clarkii	**1 菌株**
Bacillus pseudofirmus	**1 菌株**

[a)]種まで同定されている生物種の中で、分離菌株の 16S rDNA 塩基配列と最も高い相同性を示した 16S rDNA 塩基配列を持った生物種。

KU50 株のドラフトゲノムの解読と OF4 株ゲノムとの比較

2 つの *B. pseudofirmus* 株の生育におけるイオン依存性の違いを調べるため、KU50 株のドラフトゲノムをタカラバイオ株式会社ドラゴンジェノミクスセンターで解読した。得られたゲノムのデータは EDENA (http://www.genomic.ch/edena.php)[4]でアッセンブリーされ、1,306 個のコンティグが得られた。次に、ORF finder (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html) と BLAST Search (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)、または *in silico* MolecularCloning Genomics Edition を用いてこれらのコンティグから推定上の遺伝子を抽出し、相同性検索を行った。得られたアノテーションデータをもとに OF4 株と KU50 株の違いを抽出した。まず、OF4 株の Na^+の循環系を構成する Na チャネルと Na^+/H^+アンチポーターを比較した。Na チャネルの遺伝子(*ncbA*)はどちらの菌株にも 1 つだけ存在し、どちらも 284 アミノ酸残基からなるタンパク質をコードしていることが推定された。284 アミノ酸残基のうち 6 箇所のアミノ酸残基において相違が認められ、そのうちの 1 箇所がイオン選択フィルターであることが明らかとなった。このことは、KU50 株の Na チャネルのイオン選択性が OF4 株のものと異なることを示唆している。また、細胞内の酸性化に直接関与する主要な Na^+/H^+アンチポーター(MrpABCDEFG システム)を OF4 株は 1 セットしか持っていないが、KU50 株は 2 セット保持していることが明らかとなった。この 2 つの Mrp システムのイオン選択性に違いがあるのかどうかは一次構造上の比較からは明らかになっていないが、一方は OF4 株の Mrp システムと 89～100%の高い相同性があり、もう一方は相同性が 44～61%と低かったことから、イオン選択性に違いがあってもおかしくはない。以上のことから、KU50 株は Na^+の取り込み系と排出系の両方において、OF4 株とは相違があり、Na^+以外のイオンを(も)アルカリ環境への適応に利用している可能性が考えられた(図 3)。そのほかの特徴として、KU50 株のゲノムには、ビタミン B_{12} 合成経路に関わる遺伝子群(*cysG, cbiX, cbiL, cbiH, cbiF, cbiG, cbiD, cbiJ, cbiE, cbiT, cbiC, cbiA, btuR*)や、イノシトールの代謝に関わる遺伝子群(*iolG, iolE, iolI, iolD, iolB, iolC, iolJ*)、胞子の酸化ストレス耐性に関わる遺伝子群(*mnxABCDEFG*)など、OF4 株には存在しない代謝経路が存在することが明らかとなった。また、今回のドラフトゲノムからは OF4 株の持つ細胞壁合成遺伝子群(*slpA, slpA2, csaA, csaB*)が見つかっておらず、OF4 株と KU50 株の細胞表層に違いがあることが示唆された(図 3)。OF4 株のもつ SlpA レイヤーはアルカリ pH へのアップシフト時の適応に重要な役割を持っていることが知られている [3]。したがって、KU50 株の細胞表層がどのような構造で、どのようにアルカリ環境への適応に関与しているのかは興味深い点である。

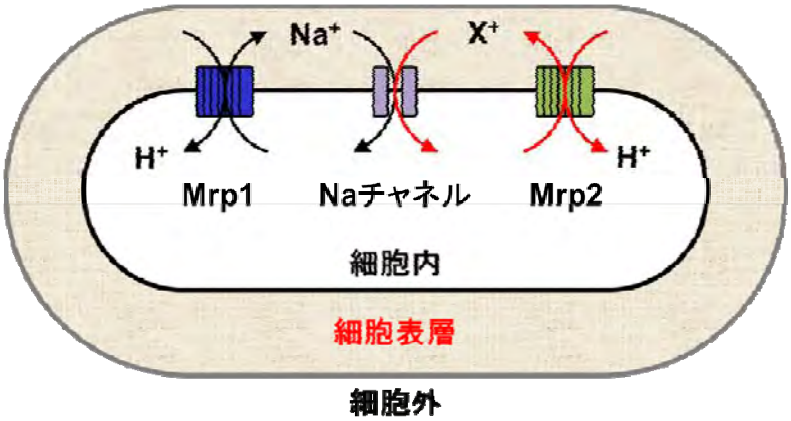

図 3. *B. pseudofirmus* KU50 株のゲノム解読から推察されるアルカリ環境適応機構のモデル
B. pseudofirmus OF4 株と異なる箇所を赤い矢印と赤い文字で示した。OF4 株の MrpABCDEFG システムと高い相同性を持つ KU50 株の Mrp1 と Na チャネルが Na^+の循環に共役して細胞内を酸性化する。KU50 株には別の MrpABCDEFG システム(Mrp2)がある点と Na チャネルのイオン選択性に関わるアミノ酸残基が OF4 株とは異なっていた点から、別のカチオン(X^+)の循環機構と共訳した細胞内酸化機構も持つことが推察される。加えて、細胞表層が OF4 株とは異なることが示唆される。

今後の展望

本研究で用いた低 Na^+培地中でのスクリーニングによって得られた好アルカリ性細菌は、イオンチャネルのイオン選択フィルター部位にピンポイントで変異が入っていた。この変異が実際に Na チャネルのイオン選択性に影響を与えるかについては現在調査中であるが、もしイオン選択性が異なっているならば、好アルカリ性細菌を用いた本スクリーニング系が別のイオンの輸送体の中にあるイオン選択部位の推定にも活用できるかもしれない。また、今回単離された KU50 株のゲノム中の様々な特徴が、実際に細胞内の酸性化や Li^+耐性に関与しているのかどうかについては、今後、これらの遺伝子の欠損株や変異株を構築することで確認する必要がある。このような研究の遂行よって、好アルカリ性細菌の新たなアルカリ環境適応機構が明らかになることが期待される。

謝辞

本研究は東洋大学 平成 23 年度 特別研究の支援を受けて実施されました。

参考文献

1) Fujinami S. and Fujisawa M. 2010. Industrial applications of alkaliphiles and their enzymes – past, present and future. Environ. Technol. 31: 845~856.
2) Gilmour R. and Krulwich T. A. 1997. Construction and characterization of a mutant of alkaliphilic *Bacillus firmus* OF4 with a disrupted *cta* operon and purification of a novel cytochrome bd. J. Bacteriol. 179: 863~870.
3) Gilmour R., Messner P., Guffanti A. A., Kent B., Scheberi A., Kendrick N., and Krulwich T. A. 2000. Two-dimensional gel electrophoresis analyses of pH-dependent protein expression in facultatively alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4 lead to characterization of an S-layer protein with a role in alkaliphily. J. Bacteriol. 182: 5969~5981.
4) Hernandez D., François P., Farinelli L., Osterås M., Schrenzel J. 2008. De novo bacterial genome sequencing: millions of very short reads assembled on a desktop computer. Genome Research. 18: 802~809.
5) Hicks D. B., Liu J., Fujisawa M., and Krulwich T. A. 2010. F_1F_o-ATP synthases of alkaliphilic bacteria: lessons from their adaptations. Biochim. Biophys. Acta. 797: 1362~1377.
6) Horikoshi K. 1999. Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63: 735~750.
7) Ito M., Guffanti A., Zemsky J., Ivey D. M., and Krulwich T. A. 1997. Role of the *nhaC*-encoded Na^+/H^+ antiporter of alkaliphilic *Bacillus firmus* OF4. J. Bacteriol. 179: 3851~3857.
8) Janto B., Ahmed A., Ito M., Liu J., Hicks D. B., Pagni S., Fackelmayer O. J., Smith T. A., Earl J., Elbourne L. D., Hassan K., Paulsen I. T., Kolstø A. B., Tourasse N. J., Ehrlich G. D., Boissy R., Ivey D. M., Li G., Xue Y., Ma Y., Hu F. Z., Krulwich T. A. 2011. Genome of alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4 reveals adaptations that support the ability to grow in an exterenal pH range from 7.5 to 11.4. Environ. Microbiol. 13: 3289~3309.
9) Krulwich T. A., Ito M., and Guffanti A. A. 2001. The Na^+-dependence of alkaliphily in *Bacillus*. Biochim. Biophys. Acta. 1505: 158~168.
10) Tiago I., Pires C., Mendes V., Morais P. V., da Costa S. M., and Verissimo A. 2006. *Bacillus foraminis* sp. nov., isolated from a non-saline alkaline groundwater. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56: 2571~2574.

Journal of Japanese Society for Extremophiles (2012) Vol.11, 75-82

MINI REVIEW

Arakawa K.

Comparative metabolomics of anhydrobiosis in tardigrade *Ramazzottius varieornatus*

比較メタボロミクスによるヨコヅナクマムシ乾眠機構の解明

慶應義塾大学先端生命科学研究所
荒川 和晴

Institute for Advanced Biosciences, Keio University, 5322 Endo, Fujisawa, Kanagawa, 252-0882, JAPAN

Corresponding author: Kazuharu Arakawa, gaou@sfc.keio.ac.jp
Tel/Fax: 0466-47-5099

Received: Nobember 6, 2011 / Accepted: December 16, 2011

Abstract Limno-terrestrial tardigrades can withstand almost complete desiccation through a mechanism called anhydrobiosis, and several of these species have been shown to survive the most extreme environments through exposure to space vacuum. Molecular mechanism for this tolerance has so far been studied in many anhydrobiotic metazoans, leading to the identification of several key molecules such as the accumulation and vitrification of trehalose as well as the expression of LEA proteins to prevent protein aggregation. On the other hand, the understanding of comprehensive molecular mechanisms and regulation machinery of metabolic compounds during anhydrobiosis is yet to be explored. In this review, I report and summarize the recent progress in the comprehensive metabolome analysis using the tardigrade *Ramazzottius varieornatus*, which is a potential model species for anhydrobiosis. In order to analyze the metabolic changes in the active and dehydrated states, metabolome is measured in both conditions using two types of high-throughput mass spectrometry (MS) systems, liquid chromatography time-of-flight MS (LC-TOFMS) for lipids and sugars and capillary electrophoresis TOFMS (CE-TOFMS) for primary metabolite. Increase, but no significant accumulation of trehalose in this species was confirmed, suggesting a more complex mechanism for anhydrobiosis in comparison to other metazoans. While changes in gene expression profiles are limited in between active and tun states, dynamic changes were observed in the metabolism of this species in response to desiccation. Changes in the metabolic profiles suggest complex intracellular responses to oxidative and osmotic stress.

Keywords: Anhydrobiosis, metabolomics, tardigrade, cryptobiosis, *Ramazzottius varieornatus,* oxidative stress
キーワード: 乾眠、メタボロミクス、クマムシ、クリプトバイオシス、ヨコヅナクマムシ、酸化ストレス

1. 第三の生命状態「クリプトバイオシス」

生命とは何か。この究極の問いへの回答は生物学的・物理学的立場などから繰り返し試みがあるものの依然として哲学の域を出ないが、散逸構造維持のために代謝が不可欠であるという点は共通認識の一つであると思われる。あまりにも有名なシュレディンガーによる議論では、生物は「負のエントロピー」を絶えず取り込むことによって生命活動を維持し、「最大エントロピー」状態である「死」から逃れている、と述べられている [26]。このような代謝を軸とした不可逆な生と死の概念は広く一般に受け入れられているものであるが、生物は常に例外の宝庫である。主に陸生の非脊椎動物を中心としたいくつかの生物種は、さまざまな環境変動（乾燥・低温・低酸素・浸透圧・毒素など）によってクリプトバイオシスと呼ばれる無代謝の休眠状態に移行することができ、環境の改善によって速やかに生命活動を再開することができる [17]。よって、クリプトバイオシスは可逆的な代謝活動の停止であり、恒常的な代謝活動が見られる「生」、不可逆的な代謝活動の停止である「死」に加えた第三の生命状態と位置づけられる [2]。つまり、クリプトバイオシスの分子機構に関する研究によって、生命活動とは何か、不可逆な生命活動の停止状態である「死」とは何か、を明らかにしていくことができると考えられる。

クリプトバイオシスの分子機構は未知の部分が多いが、その中で現在最も研究が進んでいるのが乾眠（アンハイドロバイオシス）である[4, 9, 31, 32]。クリプトバイオシスが誘導される環境変動は基本的に溶媒である水に影響を与えるものばかりであるが、乾眠ではより直接的に、周囲の乾燥によって生体内の水分を数%にまで減少させ[5]、この量の水分量では細胞内の分子が水和されないため、無代謝状態へと移行する。乾眠中は生命活動が停止しているために数年から数十年の長期に渡って保存が可能であり、真空中などに置く事によって酸化を妨げることができれば半永久的な保存も可能であると考えられている[14, 22]。さらに、乾眠状態では細胞中にほとんど水が存在しないためにさまざまな極限環境への耐性があることが知られており、例えばクマムシでは-200℃から100℃程度の温度、真空から7.5GPaの圧力、アルコール・臭化エチル・アセトニトリルなどの薬品、6,000Gy のγ線などの状態に置かれた後にも吸水によって速やかに活動を再開できる[32, 33]。このような極限環境耐性の最も象徴的なものが Jönsson らによって報告された宇宙空間への暴露実験であり、割合は少ないものの、１０日間の真空・超低温・宇宙線への暴露後にクマムシの乾眠からの復帰が見られている[15]。クリプトバイオシスでは如何にして無代謝状態を挟みながらも生体の構成要素をこのように頑強に維持し続けられているのか、そして、如何にして生命活動の再開を可能にしているのか。その分子機構を解き明かすことは、生命活動の本質に迫る近道と成りうる。

2.多様な乾眠機構

乾眠はバクテリアや酵母などの単細胞生物、そしてワムシ、線虫、クマムシ、アルテミア、ネムリユスリカなどの微小動物に幅広く見られ[31]、一定以下の大きさの生物においては周辺環境の乾燥に際しては物理的な移動や脱水の回避ではなく乾燥耐性を持つという戦略が進化的に有効であったことが伺える。一方で、乾眠移行の分子機構自体はある程度多様に、さらにいくつかの機構に関しては進化的に独立に獲得されていると考えられる。例えば、ワムシやアルテミアでは耐性卵、ネムリユスリカでは幼虫、線虫では耐性幼虫など特定の発生ステージにおいてのみ乾眠移行が可能であるのに対し、クマムシでは卵・幼体・成体の全ステージでの乾眠が可能である[10]。また、クマムシでは乾眠に際して身体を樽のような形に縮め表面積を縮小させるtun形成が行われる[20]。さらに、乾眠に必要な時間に関しても、高い湿度で数日間かけて乾燥することが不可欠なネムリユスリカのような遅い乾眠移行をするグループと[3]、すぐに相対湿度 0%に近いような極めて乾燥した状態に置かれても速やかな乾眠移行が可能な一部の線形動物やクマムシのようなグループに二分されることが明らかになってきている[27]。

細胞のほぼ完全な脱水という劇的な環境変動からの生命活動の再開を可能にするためには、何よりも乾眠時に生体膜やDNA、そしてタンパク質などの細胞内の各要素を、再水和時にそれらの機能を維持できるよう乾燥によるダメージから保護することが肝要である。このような保護機構として、アルテミアやネムリユスリカなどにおいては非還元糖であるトレハロースの蓄積が顕著であり、乾眠時に乾燥重量の実に10〜20%にまで至ることが知られている[30]。トレハロースは生体内で水を置換し、タンパクや膜を保護し、また、抗酸化作用を持つ事などが知られている[23]。特に、ネムリユスリカにおいてはトレハロースのガラス化による保護が必須であり、速い乾燥ではトレハロースの蓄積量が不十分になってしまい蘇生ができないことが詳細な解析によって示されている[24]。その後、線虫においてもトレハロースが乾眠時の膜構造の維持に必須であることが示されるなど[6]、特に遅い乾眠においてはトレハロースがその分子機構の鍵となっている。

一方、トレハロースに依存しない乾眠機構の存在も次々と明らかになってきている。トレハロース合成酵素とトレハロースを細胞内にもたないが高い乾眠能力を示すワムシが報告され[18]、トレハロース合成酵素のノックアウト実験によって、酵母では乾燥耐性にトレハロースが必須ではないことが示された。また、比較的速い乾眠が可能なクマムシにおいては、多くの種において乾眠時にトレハロースが数倍に増加するものの、その量は乾燥重量の 1%にも満たずこの量では水分子の置換やガラス化による細胞の保護は困難であること、さらに、オニクマムシ(*Milnesium tardigrada*)においてはそもそも細胞内トレハロースが検出できないことなどが明らかとなった[12]。

だが、遅い乾眠であればトレハロース依存で、速い乾眠であれば非依存かといえば話はそう単純ではない。線虫 *Panagrolaimus superbus* はいきなり相対湿度 0%に置かれても乾眠が可能であるが、この種では環境変動に関わらず常に乾燥重量の10%ほどのトレハロースを細胞内に準備することで速い乾眠に適応している[27]。つまり、トレハロース非依存で速い乾眠が可能なクマムシにおいては特定の分子に強く依存せずにおそらく複数の要素が関与し、恒常的に乾眠に備えている可能性が高い。

3. クマムシの乾眠

クマムシ乾眠機構の解析は、現在飼育系が確立されているオニクマムシ[29]とヨコヅナクマムシ(*Ramazzottius varieornatus*)[13]の２種を中心に進められており、まずは乾眠における分子変動をゲノミクス、トランスクリプトミクス、プロテオミクスを始めとした所謂「オミクス」のアプローチによって網羅的に捉えることが試みられている[20]。現状ではまだ他の生物にも共通に見られる乾燥ストレスに関連

したパスウェイの探索に留まっているものの、これまでのドイツのグループによるオニクマムシの一連のトランスクリプトーム及びプロテオーム解析では乾眠における広範囲な生体内パスウェイ及びタンパクの関与が明らかになりつつある[7, 19, 25]。例えば、細胞膜上に存在し水の排出に関わっていると考えられるアクアポリン（特に AQ4）、MutS や RAD51 などの DNA 修復関連のパスウェイ、酸化ストレス応答に関わる Super Oxide Dismutase (Mn)や Glutathione transferase のパスウェイなどが乾眠時の発現亢進からその関与が示唆されている。乾燥ストレスや浸透圧ストレス時には DNA の損傷や生体タンパクの酸化を引き起こすフリーラジカルが産出されることが知られており、乾眠において酸化ストレス応答は細胞の機能維持という観点から中心的役割を担っていると考えられる。さらに、脱水によるタンパクの凝縮を押さえるため、他の生物では主に熱や低酸素ストレスにおいて発現が見られるストレス応答型分子シャペロンなどの発現がクマムシの乾眠時には顕著である。オニクマムシにおいては特に細胞質中でのタンパクの正しいフォールディングを助ける熱ショックタンパク(HSP)70 の発現変動が見られ、それ以外にも HSP90, HSP60, HSP40, HSP20, GroES, GrpE ファミリーなどが存在していることが確認されている。

乾眠において酸化ストレスと同等に重要な生体保護作用としてタンパクの凝縮抑制があり、そのためにほとんどの乾眠を行う生物が LEA (Late Embryogenesis Abundant)と呼ばれるタンパクを持つ[11]。このトレハロースと並んで乾眠機構の説明に欠かせないタンパクはもともと植物の種子で発見され、その詳細な分子機構には未知の点も多いものの、乾燥ストレスにおいては細胞保護のさまざまな面で役割を果たす万能選手である。まず、LEA タンパクは極めて親水性が高く、長時間の煮沸を経ても可溶性・抗凝縮性を維持できるため、乾燥ストレス時にタンパクの凝縮抑制に関わることが示唆されている。また、このタンパクは水和時には構造をとらないが、乾燥時には特徴的なαヘリックス構造を形成し、分子シールドとしての機能を示し、さらにはミトコンドリアの膜の保護やトレハロースなどの糖のガラス化を安定化する作用までが報告されている。オニクマムシのプロテオミクスでは乾眠における LEA オーソログの誘導が観察されており、クマムシの乾眠においても LEA が関与している可能性がある。

図 1 ：活動状態のヨコヅナクマムシ

現在我が国のクマムシ研究グループでは、堀川らによって北海道から採取され、安定した飼育系のもと単系統化(YOKOZUNA-1)されたヨコヅナクマムシを解析対象としている[13]。ヨコヅナクマムシはその名の通り、飼育の容易さや極限環境耐性、そして乾眠移行時間の短さなどにおいて他のクマムシを凌駕する性質を兼ね揃えており、その極めて急速な乾眠移行においては、他の乾眠生物に見られるような遺伝子発現の変動がほとんど見られない。よって、この種は、どのようにして細胞内の構成要素の大きな変化を伴わずに乾眠という劇的な生命活動状態の変化を起こしているのかを調べる上でのモデル生物として適していると考えられる。ヨコヅナクマムシは既にクマムシとしては初となる約 60Mbp の高精度なドラフトゲノムが解読され機能アノテーションが進んでいる[16]。このヨコヅナクマムシにおいて、最近山口らによって二つの新規な高可溶性タンパクファミリー CAHS/SAHS (Cytoplasmic/Secretory Abundant Heat Soluble)が発見された[34]。この二つの新規タンパクファミリーは LEA のような抗凝縮性と、乾燥時のαヘリックス構造変化を示し、緩歩動物門において保存され、ゲノム中に複数コピー存在

することなどから、クマムシの乾眠において重要な役割を担っている可能性が示された。実際、ヨコヅナクマムシにおいては CAHS/SAHS は通常時でも恒常的に大量発現しており、速い乾眠を行う生物らしく常に乾眠に備える戦略があらためて確認された。

4. 乾眠のメタボロミクス

ヨコヅナクマムシでは新規のタンパクファミリー CAHS と SAHS が恒常的に大量に発現することにより、LEA のようなタンパク凝縮抑制やさまざまな乾燥ストレス応答にて働いている可能性が明らかとなったが、これだけでは乾燥によって引き起こされるはずの酸化ストレスへの対応を全て説明できるわけではない。また、CAHS や SAHS は極めて弱い乾眠能力しかもたないドゥジャルダンヤマクマムシ(*Hypsibius dujardini*)においても保存されていることから、ヨコヅナクマムシにおける速い乾眠を可能とする分子機構についてもさらなる解析が不可欠である。ヨコヅナクマムシの乾眠では転写・翻訳による発現変動が限定的であるため、自ずと解析対象はより直接的な細胞内化合物の変化動態、即ち、メタボロームとなる。

メタボローム解析には質量分析器 (Mass Spectrometer: MS)を用いるが、細胞から抽出された化合物は質量分析器にかけてそれぞれの量を測定する前に個々に分離される必要がある。そのため、メタボローム解析においては液体クロマトグラフィ(Liquid Chromatography: LC)、ガスクロマトグラフィ(Gas Chromatography: GC)、そしてキャピラリー電気泳動(Capillary Electrophoresis: CE)などによる化合物の分離を組み合わせた LC-MS, GC-MS, CE-MS といったシステムを用いる。これらの分離方法は測定対象の化合物の種類によって効率が異なり、LC は中性物質、GC は揮発性物質、CE はイオン性物質の分離に適している。一般的に中心炭素代謝などの一次代謝の中間代謝物質にはイオン性の化合物が多く、これらを正確に分離・測定するためには CE-MS が最も適している[21, 28]。同様に、脂質や糖などの中性物質には LC-MS が、脂肪酸やアルコールなどの気化しやすい物質には GC-MS が適しており、網羅的な代謝物質の測定にはどれか一つのシステムを用いるのではなく、これらのシステムを組み合わせた解析が不可欠である。例えばオニクマムシのメタボローム解析についてはこれまでに一件のみ報告があるが[1]、この解析では一次代謝を見ているにも関わらず分離能が一番低い GC-MS システムを用いているため、代表的な糖やアミノ酸などの限られた物質のみしか検出できず網羅性が低く、結果として乾眠機構を明らかにする上では欠かせない全代謝の観察には至っていない。

そこで、我々はイオン性化合物と中性物質を網羅的に解析するために、CE 及び LC システムによる化合物の分離と、精密質量数を得るために飛行時間型(Time-of-flight: TOF)MS を組み合わせた CE-TOFMS 及び LC-TOFMS によってヨコヅナクマムシの代謝変化を調べた。その結果、8 種の糖、合計 373 種の脂質、269 種の同定されたイオン性化合物、そして 1328 種の未知ピークを得た。

クマムシは一般的に糖によるガラス化を行わないが、ヨコヅナクマムシにおいても図 2 に示すようにトレハロースが糖種の中では多く存在しており、また、乾眠によって大幅な増加が見られる。一方で、増加後の量はこれまでに多くのクマムシで報告されてきたように乾燥重量の 1%にも満たない量であり、細胞をガラス化して保護するというよりは、浸透圧ストレスにおいてトレハロースを部分的に活用していると見るべきだろう。

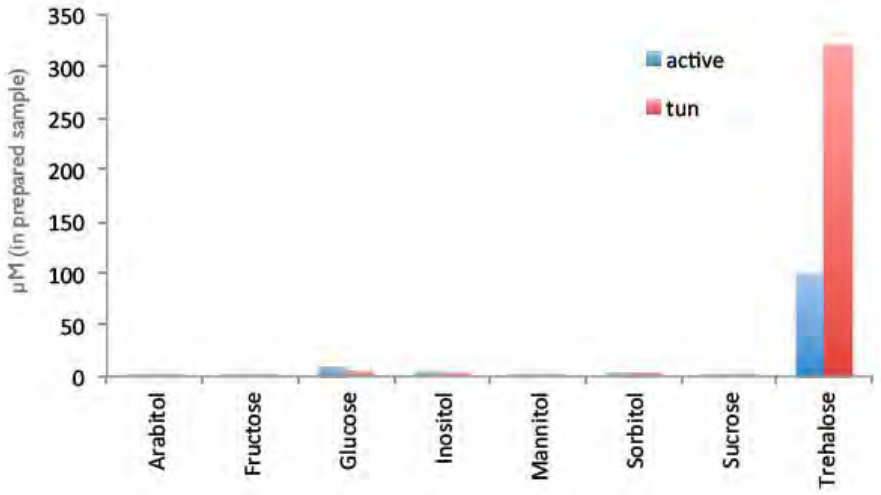

図 2 ：ヨコヅナクマムシ通常時（青）と乾眠時（赤）の糖濃度

糖類の中ではトレハロースが顕著に多く、乾眠時に約 3.5 倍にまで増加しているが、それでも乾燥重量の 0.735%程度の量であり、トレハロース蓄積型のネムリユスリカなどの乾眠機構とは異なることがわかる。

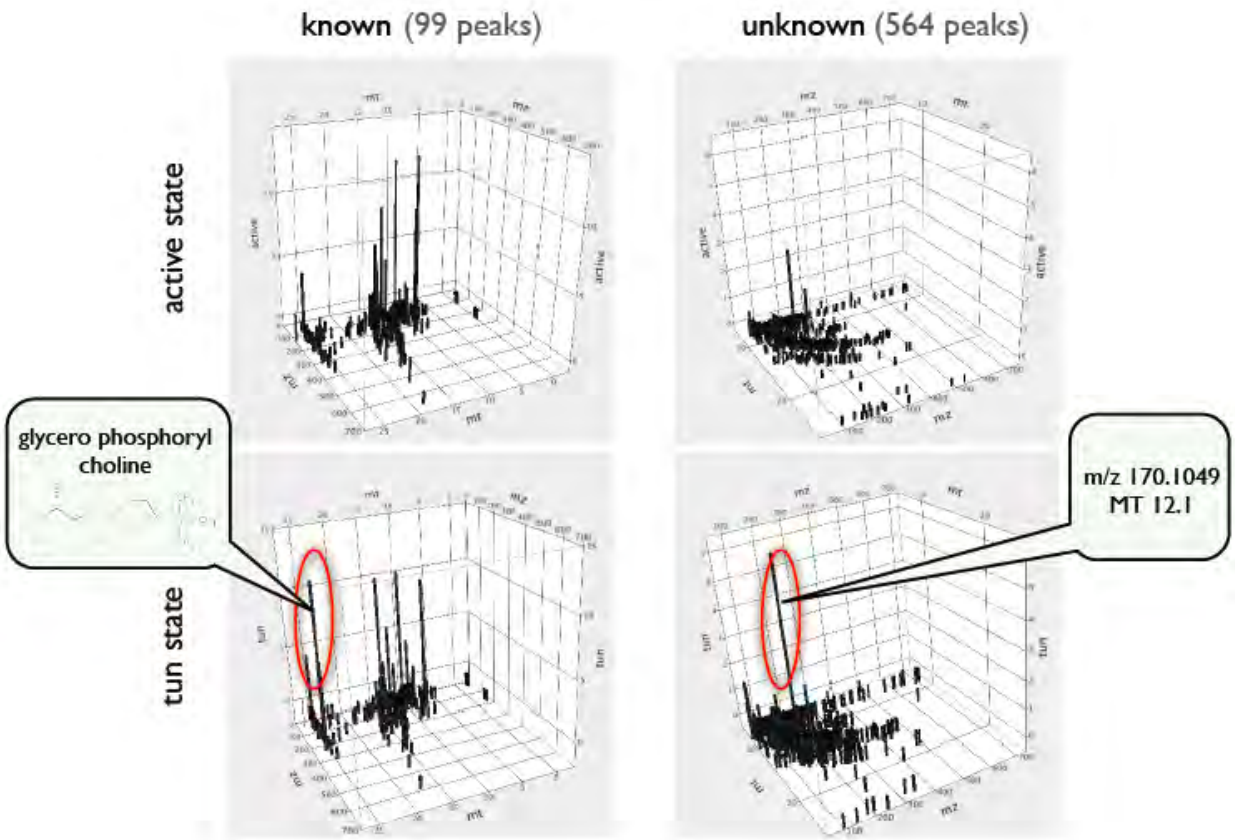

図 3 ：ヨコヅナクマムシ内カチオン分子のメタボローム結果。上の列が通常時の結果、下の列が乾眠時の結果、左の列が化合物を同定できたピーク、右が未同定のピーク。同定されたピークでは Glycerophosphocholine の増加が tun で顕著であり、未同定のピークでは質量 170.1049 の未知物質が蓄積していることがわかる。各代謝物質は質量/電荷(m/z)とキャピラリー電気泳動の泳動時間（MT）で定義される。

ではヨコヅナクマムシの速い乾眠を実現している代謝機構は何なのだろうか。最も顕著な物質の変化はカチオンに見られた（図 3）。通常時と乾眠時のメタボロームプロファイルを比較すると、大多数の代謝物質には極端な変動は見られないものの、Glycerophosphocholine(GPC)が著しい増加を見せている。量的には GPC 程の蓄積がないが、変化量では通常時と乾眠時の代謝物質量に有意な増加(Welch t-test, $p < 0.05$)を見せた 17 種の化合物のうち上位 4 種をコリン代謝系の中間化合物（Phosphorylcholine, GPC, Ethanolamine phosphate, Choline, それぞれ約 3 ー8 倍変動）が占めていた。アニオンでは乾眠時に有意に増加した物質 22 種中 7 種を異なる長さの脂肪酸が占めており、脂質が全体的に減少していることから、脂質を分解して得られたグリセロールを使用して GPC を短時間で合成している非常にダイナミックな乾眠応答が起きていると考えられる。GPC は常に浸透圧ストレスにさらされる腎臓などで主要な働きをすることが知られている酸化ストレスや浸透圧ストレスにおいて重要な分子であり、タンパク質の保護や、水分子のように正電荷と負電荷を同一分子中に持つベタインとして細胞質中の遊離金属イオンを緩衝する働きが報告されている [8]。さらに、ヨコヅナクマムシの乾眠では他にもさまざまな乾燥ストレス応答が起きていることがうかがえる。GPC の他にも酸化ストレス応答で代表的な酸化型グルタチオンやビオチンも大きく増加している他、有意な増加を示す化合物の多くはベタインかキレート作用を持つ分子であった。これら代謝の全体像を、簡単のために有意に変動した物質のみを取り出し、Pathway Projector を用いて KEGG グローバルマップ上に可視化したものが図 4 である。乾眠によって代謝が一旦停止するため、エネルギー源である ATP などの核酸やアミノ酸のほとんどは急激に使い尽くされ減少する。それに呼応し、GPC やグルタチオン、ビオチンなどといった酸化・浸透圧ストレス対応のパスウェイが亢進し、中間代謝物質はそれぞれのパスウェイで最も近傍のキレートやベタインへと代謝・合成され、蓄積される。即ち、できうる限り短時間で、残されたエネルギーを有効活用しながら全代謝系で乾燥による浸透圧・イオン・酸化のストレスに対応している様子が見えてきた。

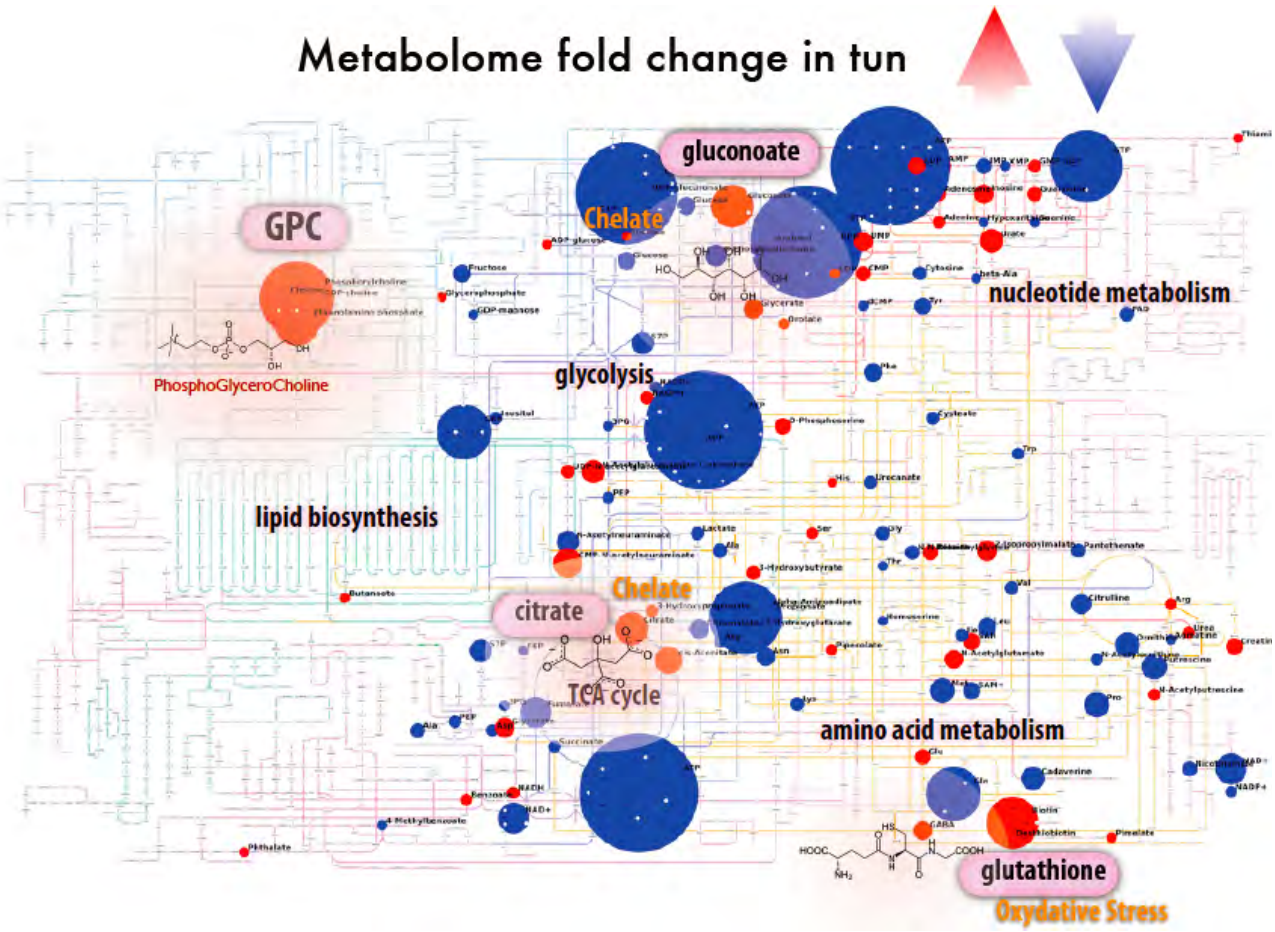

図 4 ：ヨコヅナクマムシ乾眠の比較メタボロミクス
KEGG Pathway 上に有意な変化を示した化合物の fold change を可視化した。乾眠時（tun）に上昇した物質が赤で、減少した物質が青で示されている。エネルギー代謝が全体的に減少する中で、各代謝経路毎に増加している物質が存在する。

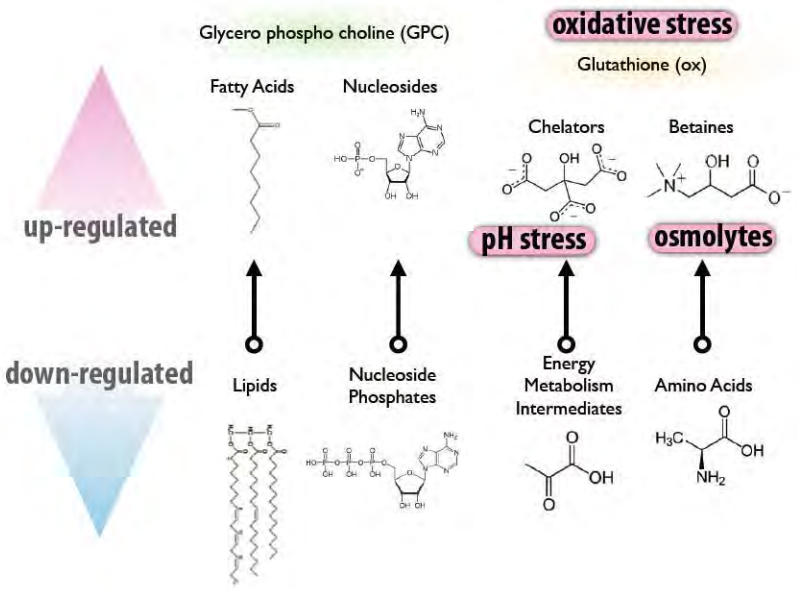

図 5 ：ヨコヅナクマムシ乾眠における代謝応答のまとめ
脂質が分解され、その中間代謝物質である複数の脂肪酸が上昇するが、グリセロールは主に酸化ストレス応答に重要な Glycerophosphocholine の合成に使われる。他にもアミノ酸や高エネルギーリン酸結合を持つ核酸やなどがベタインやキレート分子へと代謝されることにより、パスウェイ全体で動的に乾燥ストレスに対応している様子がうかがえる。

5. 今後の展望

ヨコヅナクマムシは他のクマムシに比べると飼育が容易であるが、増殖効率は他のモデル生物に比べると悪く、個体サイズも小さいことから大規模なメタボローム解析などを行おうとすると十分なサンプル量を得るのに多大な時間を要する。そのため、現段階ではまだ通常状態と乾眠時の比較メタボロミクスのみが達成されている。一方で、乾眠の分子機構を理解するためには乾眠への移行だけでなく、停止された代謝の再開を解析することも不可欠であり、また、それを時系列で観察することが望ましい。実際、乾眠時に著しい蓄積が見られた GPC とコリン代謝はグリセロリン脂質の合成と密接な関係にあり、細胞膜の保全において重要な役割を演じる。乾眠における脱水は如何にさまざまなストレス応答によって保護策がとられているとしても生体膜に少なからぬ損傷を与える可能性は十分にあると考えられるので、ストレス応答として GPC を蓄積しつつ乾眠時は細胞を保護し、吸水後はこれを代謝して膜の保全に活用していると考えれば、非常に合理的なシステムであるように思える。よって、今後代謝再開時のメタボロミクスと、その代謝を担う酵素の制御についても合わせて解析していくことで、システムとしての乾眠を理解していくことができるのではないかと思う。

謝辞

本研究は慶應義塾大学先端生命科学研究所 伊藤卓朗研究員、曽我朋義教授、冨田勝教授、東京大学 國枝武和助教、パリ第 5 大学　堀川大樹研究員との共同研究である。また、本研究は科学研究費補助金 若手 A (No.222681029, 2010)及び山形県と鶴岡市による支援を受けている。

引用文献

1) Beisser, D., Grohme, M. A., Kopka, J., Frohme, M., Schill, R. O., Hengherr, S., Dandekar, T., Klau, G. W., Dittrich, M. and Muller, T. 2012. Integrated pathway modules using time-course metabolic profiles and EST data from Milnesium tardigradum. BMC Syst Biol. 6: 72.
2) Clegg, J. S. 2001. Cryptobiosis--a peculiar state of biological organization. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 128: 613-24.
3) Cornette, R. and Kikawada, T. 2011. The induction of anhydrobiosis in the sleeping chironomid: current status of our knowledge. IUBMB Life. 63: 419-29.
4) Crowe, J. H., Hoekstra, F. A. and Crowe, L. M. 1992. Anhydrobiosis. Annu Rev Physiol. 54: 579-99.
5) Danks, H. V. 2000. Dehydration in dormant insects. J Insect Physiol. 46: 837-852.
6) Erkut, C., Penkov, S., Khesbak, H., Vorkel, D., Verbavatz, J. M., Fahmy, K. and Kurzchalia, T. V. 2011. Trehalose renders the dauer larva of Caenorhabditis elegans resistant to extreme desiccation. Curr Biol. 21: 1331-6.
7) Forster, F., Liang, C., Shkumatov, A., Beisser, D., Engelmann, J. C., Schnolzer, M., Frohme, M., Muller, T., Schill, R. O. and Dandekar, T. 2009. Tardigrade workbench: comparing stress-related proteins, sequence-similar and functional protein clusters as well as RNA elements in tardigrades. BMC Genomics. 10: 469.
8) Gallazzini, M. and Burg, M. B. 2009. What's new about osmotic regulation of glycerophosphocholine. Physiology (Bethesda). 24: 245-9.
9) Garcia, A. H. 2011. Anhydrobiosis in bacteria: from physiology to applications. J Biosci. 36: 939-50.
10) Guidetti, R., Altiero, T. and Rebecchi, L. 2011. On dormancy strategies in tardigrades. J Insect Physiol. 57: 567-76.
11) Hand, S. C., Menze, M. A., Toner, M., Boswell, L. and Moore, D. 2011. LEA proteins during water stress: not just for plants anymore. Annu Rev Physiol. 73: 115-34.
12) Hengherr, S., Heyer, A. G., Kohler, H. R. and Schill, R. O. 2008. Trehalose and anhydrobiosis in tardigrades--evidence for divergence in responses to dehydration. FEBS J. 275: 281-8.
13) Horikawa, D. D., Kunieda, T., Abe, W., Watanabe, M., Nakahara, Y., Yukuhiro, F., Sakashita, T., Hamada, N., Wada, S., Funayama, T., Katagiri, C., Kobayashi, Y., Higashi, S. and Okuda, T. 2008. Establishment of a rearing system of the extremotolerant tardigrade Ramazzottius varieornatus: a new model animal for astrobiology. Astrobiology. 8: 549-56.
14) Jönsson, K. I. and Bertolani, R. 2001. Facts and fiction about long-term survival in tardigrades. J Zool. 255: 121-123.
15) Jönsson, K. I., Rabbow, E., Schill, R. O., Harms-Ringdahl, M. and Rettberg, P. 2008. Tardigrades survive exposure to space in low Earth orbit. Curr Biol. 18: R729-R731.
16) Katayama, T. and Kunieda, T. 2010. Genome sequencing and assembly of anhydrobiotic extremotolerant tardigrade. J Jpn Soc Extremophiles. 9: 98-105.
17) Keilin, D. 1959. The problem of anabiosis or latent life: history and current concept. Proc R Soc Lond B. 150: 149-191.
18) Lapinski, J. and Tunnacliffe, A. 2003. Anhydrobiosis without trehalose in bdelloid rotifers. FEBS Lett. 553: 387-90.
19) Mali, B., Grohme, M. A., Forster, F., Dandekar, T., Schnolzer, M., Reuter, D., Welnicz, W., Schill, R. O. and Frohme, M. 2010. Transcriptome survey of the anhydrobiotic tardigrade Milnesium tardigradum in comparison with Hypsibius dujardini and Richtersius coronifer. BMC Genomics. 11: 168.
20) Mobjerg, N., Halberg, K. A., Jorgensen, A., Persson, D., Bjorn, M., Ramlov, H. and Kristensen, R. M. 2011. Survival in extreme environments - on

the current knowledge of adaptations in tardigrades. Acta Physiol (Oxf). 202: 409-20.

21) Monton, M. R. and Soga, T. 2007. Metabolome analysis by capillary electrophoresis-mass spectrometry. J Chromatogr A. 1168: 237-46; discussion 236.

22) Neumann, S., Reuner, A., Brummer, F. and Schill, R. O. 2009. DNA damage in storage cells of anhydrobiotic tardigrades. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 153: 425-9.

23) Ring, R. A. and Danks, H. V. 1998. The role of trehalose in cold-hardiness and desiccation. Cryoletters. 19: 275-282.

24) Sakurai, M., Furuki, T., Akao, K., Tanaka, D., Nakahara, Y., Kikawada, T., Watanabe, M. and Okuda, T. 2008. Vitrification is essential for anhydrobiosis in an African chironomid, Polypedilum vanderplanki. Proc Natl Acad Sci U S A. 105: 5093-8.

25) Schokraie, E., Hotz-Wagenblatt, A., Warnken, U., Mali, B., Frohme, M., Forster, F., Dandekar, T., Hengherr, S., Schill, R. O. and Schnolzer, M. 2010. Proteomic analysis of tardigrades: towards a better understanding of molecular mechanisms by anhydrobiotic organisms. PLoS One. 5: e9502.

26) Schrödinger, E. 1944. What is life? The physical aspect of the living cell. New York: Cambridge University Press.

27) Shannon, A. J., Browne, J. A., Boyd, J., Fitzpatrick, D. A. and Burnell, A. M. 2005. The anhydrobiotic potential and molecular phylogenetics of species and strains of Panagrolaimus (Nematoda, Panagrolaimidae). J Exp Biol. 208: 2433-45.

28) Soga, T., Ohashi, Y., Ueno, Y., Naraoka, H., Tomita, M. and Nishioka, T. 2003. Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry. J Proteome Res. 2: 488-94.

29) Suzuki, A. C. 2003. Life history of Milnesium tardigradum Doyere (tardigrada) under a rearing environment. Zoolog Sci. 20: 49-57.

30) Tunnacliffe, A. and Lapinski, J. 2003. Resurrecting Van Leeuwenhoek's rotifers: a reappraisal of the role of disaccharides in anhydrobiosis. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 358: 1755-71.

31) Watanabe, M. 2006. Anhydrobiosis in invertebrates. Appl Entomol Zool. 41: 15-31.

32) Welnicz, W., Grohme, M. A., Kaczmarek, L., Schill, R. O. and Frohme, M. 2011. Anhydrobiosis in tardigrades--the last decade. J Insect Physiol. 57: 577-83.

33) Wright, J. C. 2001. Cryptobiosis 300 Years on from van Leuwenhoek: What Have We Learned about Tardigrades? Zool. Anz. 240: 563-582.

34) Yamaguchi, A., Tanaka, S., Yamaguchi, S., Kuwahara, H., Takamura, C., Imajoh-Ohmi, S., Horikawa, D. D., Toyoda, A., Katayama, T., Arakawa, K., Fujiyama, A., Kubo, T. and Kunieda, T. 2012. Two novel heat-soluble protein families abundantly expressed in an anhydrobiotic tardigrade. PLoS One. 7: e44209.

MINI REVIEW

Journal of Japanese Society for Extremophiles (2012) Vol.11, 83-89

Abe F.[a,b]

Direct measurement of membrane properties in piezophiles under high pressure using fluorescence depolarization technique

好圧性細菌における膜物性の直接計測
—高圧蛍光偏光解消法からのアプローチ—

青山学院大学理工学部　化学・生命科学科
（独）海洋研究開発機構　海洋・極限環境生物圏領域
阿部 文快

[a] Department of Chemistry and Biological Science, College of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University, 5-10-1 Fuchinobe, Chuo-ku, Sagamihara 252-5258, Japan.
[b] Institute of Biogeosciences, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology (JAMSTEC), 2-15 Natsushima-cho, Yokosuka 237-0061, Japan

Corresponding author: Fumiyoshi Abe, abef@chem.aoyama.ac.jp
Phone: +81-42-759-6233, Fax: +81-42-759-6511

Received: November 13, 2012 / Accepted: November 23, 2012

Abstract Deep sea is characterized by high pressure and low temperature, and the organisms inhabiting the environment have adapted to such extreme conditions. High pressure and low temperature exert profound physiological impacts on bilayer membranes, primarily resulting in tighter packing and restricting the rotational motion of acyl chains. The maintenance of appropriate membrane fluidity is crucial for the integrity of membrane proteins and cell survival under high pressure and low temperature. Of the spectroscopic techniques available to study membrane properties, fluorescence anisotropy measurement is a common useful method providing information on dynamic membrane properties. Recently we developed a new system that enabled time-resolved fluorescence anisotropy measurement under high pressure. In this paper, I describe a renewed view of the membrane properties in deep-sea piezophile *Shewanella violacea* when the cells are exposed to high pressure.

はじめに

2012 年 3 月 26 日、映画監督のジェームズ・キャメロン氏がマリアナ海溝の世界最深部 1 万メートルのチャレンジャー海淵に到達した。単独潜航としては世界初である。それに先立つ 1995 年、独立行政法人海洋研究開発機構の無人潜水艇“かいこう”は同じチャレンジャー海淵で底泥サンプリングに成功している。かいこうの探査で分離された 3,000 もの微生物株は、1000 気圧もの高水圧にさらされた深海が死の世界ではないことを物語った。海の平均深度は意外に深くおよそ 3,800 m に達する。地球全体の体積から換算するとこの地球の大部分は陸上の 380 倍、実に 380 気圧もの高圧力にさらされた環境である。なお、圧力の国際単位はパスカル (Pa) であり、本稿でもこれを用いる。陸上は 1 気圧なので 0.1 MPa、深さ 1,000 m では 10 MPa、10,000 m では 100 MPa もの水圧がかかる。『どうして深海生物はこれほどの超高圧力下で生きられるのか？』チャレンジャー号の航海から 140 年、あまたの論文をひも解いてみても決定的な答えは見つかっていない。しかし、原始生命誕生の場が深海だったとするならば、『どうやって陸上生物はこれほどの低圧力下に適応し進化してきたのか？』といった問いかけに置き換えられるだろ

う。深海生物の生態は謎に包まれており、今も多くの研究者の興味を惹きつけている。

ZoBell と Johnson は”barophile”という微生物種を定義した。Barophile は高圧力を好んで生育する微生物“好圧性細菌”を示す。ZoBell と Morita は深海底泥試料から高圧力下で増殖する微生物の存在を初めて確認し、その後 1979 年に Yayanos らが好圧性細菌の単離に成功した[23]。Yayanos はのちに、”barophile”を”piezophile”と呼ぶことを提唱し、現在広く受け入れられている。baro は重力という意味合いが強いため、piezo の方が圧力を表すのにふさわしい。Yayanos が学会でこう話してくれたことを覚えている。増殖特性を圧力の観点から分類すると、piezophilic（好圧性）の他に piezotolerant（耐圧性）と piezosensitive（圧力感受性）がある。大気圧下に棲息する生物は、基本的に圧力感受性を示し、加圧すると増殖速度が低下する。好圧性とは大気圧下よりも高圧力下で増殖速度が高まる性質のことである。また、耐圧性とは大気圧と高圧力下で同程度に増殖する場合に用いられる。これを模式的に示したのが図 1 である。

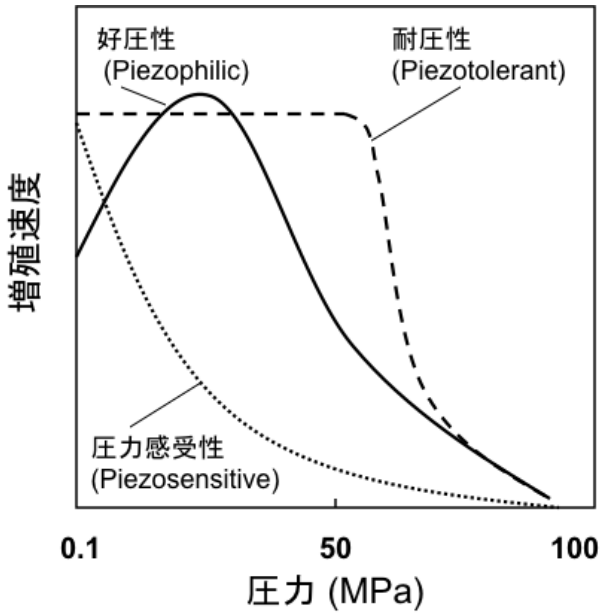

図 1. 圧力軸で見た微生物の増殖特性

では深海から分離された微生物の全てが好圧性や耐圧性を示すかと言ったら、決してそんなことはない。逆に陸上由来の微生物はみな圧力をかけると増殖できなくなるかというと、そんなこともない。しかもこうした増殖特性は、温度や培地組成を変えると大きく変化する。あくまで実験室で観察された一つの指標なのである。しかしながら分子の目で好圧性細菌と圧力感受性細菌を比較すると、転写や翻訳、タンパク質の構造と機能、あるいは脂質の動的構造といった様々なレベルで両者の圧力依存性に違いが見られる点が興味深い。好圧性細菌については、カリフォルニア大学スクリップス海洋研究所の D. H. Bartlett らの *Photobacterium profundum* SS9 と海洋研究開発機構の加藤らの *Shewanella violacea* DSS12 を微生物モデルとした分子生物学的研究が精力的に進められている。どちらの好圧性細菌も遺伝子発現やタンパク質機能に関する多数の報告があり、最近は全ゲノム配列も解読され、今や誰でもそれらの遺伝子をクローニングできるようになった[4, 21]。

細胞と生体分子に対する圧力効果

表 1 に細胞や生体分子機能に影響をおよぼす圧力のおよその下限値を示す。ただしいずれも目安程度に考えていただきたい。50 MPa 以下では、細胞運動や細胞分裂、膜輸送体を介した栄養源取り込みなどに圧力の影響が現れる[13]。膜タンパク質への影響が大きいのは、脂質二重層の圧縮に伴う高次構造の変化が大きいためである[1, 9, 15]。50~100 MPa では転写や翻訳、DNA 複製などの阻害が顕著になり、アクチンやチューブリンの脱重合、リボソームサブユニットの解離など、オリゴマータンパク質の崩壊が始まる[17–19, 22]。これは脱重合や解離に伴う負の体積変化によるもので、露出したタンパク質表面の水和による寄与が大きい。ここで体積変化とは平衡や反応に伴う系全体の体積差を指す。例えばチューブリン水溶液を考えてみると、重合しているときと比べ脱重合しているときの方がチューブリン 1 モルあたりの体積が約 90 mL 小さい[18]。よってル・シャトリエの法則に従い、加圧すると脱重合方向に平衡はシフトする。100 MPa 以下の圧力は一般に非致死的と言われ、数分、細胞によっては数時間の加圧でも生存率が大きく低下することはない。しかし今のところ、実験室条件下で 100 MPa での細胞分裂（増殖）が確認された例は、深海由来の好圧性細菌といえども報告されていない。一方、モノマータンパク質の失活や圧力変性は 100~200 MPa で始まり、DNA や RNA に至っては 1 GPa まで構造が安定である[5, 8, 14, 16]。従って、転写や翻訳、DNA 複製における圧力阻害は核酸そのものの変性ではなく、むしろそれらを操る DNA/RNA ポリメラーゼ複合体やリボソームへの影響が要因である。*S. violacea* の RNA ポリメラーゼには耐圧性があり、高圧電気泳動法による *in vitro* 解析から 140 MPa まではサブユニット構造を維持することがわかっている[12]。一方、同一条件下で大腸菌の RNA ポリメラーゼは解離してしまう。*S. violacea* の生育上限圧力が約 70 MPa であることを考えると、RNA ポリメラーゼは実に 2 倍の安全率を確保しているのだ。

表1. 細胞機能の阻害や生体高分子の変性が生じる圧力

細胞機能／構造	圧力 (MPa)
細胞運動	10
細胞分裂	20
栄養源の取り込み	15–20
アルコール発酵	25–50
膜タンパク質の機能	25–50
複製	50
転写	50–100
翻訳	50
生存率	100–200
タンパク質の重合	50–100
水溶性タンパク質の機能	100
タンパク質の変性	200
DNAの変性	1000

生体膜における高圧力適応

前項ではタンパク質を中心とした圧力効果を述べた。そこで、次に生体膜への影響について考えてみたい。基本的作用として高圧力は脂質二重層を圧縮し、アシル鎖の回転ブラウン運動を制限する。アシル鎖の長さや不飽和度、極性頭部の種類による差はあるが、おおむね人工脂質二重層の相転移温度は 100 MPa で 20~30℃上昇する。例えば、ジパルミトイルフォスファチジルコリンの場合、大気圧下の主転移温度は 42℃だが、100 MPa だと 64℃まで上昇する [9]。生体膜は組成が複雑なので明確な相転移は観察されない。しかし、膜タンパク質の機能が高圧力で大きく損なわれるのは、膜の圧縮に伴うタンパク質の構造変化によるためである。適切な膜の状態を保つことが高圧力下の生命維持に重要であることは、生物の低温適応と似ているかもしれない。低温への適応戦略の一つは脂質アシル鎖の不飽和化である。一価あるいは多価不飽和脂肪酸は立体的にかさ高いため、膜の充填を妨げ高い流動性が維持される。これにより膜タンパク質の機能が保たれるという仕組みである。Macdonald らは浅海から深海まで棲息する近縁魚類の細胞膜を調べ、圧力の影響を報告した。彼らは 蛍光偏光試薬 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatrine (DPH)を用い、高圧力下で蛍光偏光解消測定を行った。その結果、同じ圧力のもとでは深海性の魚類の方が膜の秩序が低く、流動性が高いレベルで維持されていることがわかった。また、捕獲された深度に相当する圧力をかけると、どの魚でも膜の状態がほぼ同じになることが示された [6]。生物が環境条件に合わせて膜の流動性を保つこのような仕組みを、”Homeoviscous adaptation”と呼ぶ。

深海性細菌の多くはエイコサペンタエン酸（eicosapentaenoic acid, 以下 EPA）やドコサヘキサエン酸（docosahexaenoic acid, 以下 DHA）などの多価不飽和脂肪酸を多く含むので、膜の流動性を高めると考えられている。しかし、*P. profundum* SS9 では EPA 欠損株でも野生株と同様に高圧力下で増殖する。ところが、一価不飽和脂肪酸の *cis*-vaccenic acid (C18:1)を欠くと圧力感受性を示すのである [3]。南極の氷中から発見された低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 では、EPA は低温条件下における細胞分裂に不可欠だが、ピレン分子の拡散速度で見る限り EPA の有無は膜の流動性に影響がないと結論づけられている [10]。また、*S. violacea* DSS12 では EPA を欠損すると高圧力下で増殖速度が低下する [11]。このように高圧力下や低温下で EPA が果たす役割と重要性については、菌種や培養条件、着目する形質によって結論が異なり、統一的な見解は得られていない。そもそも微生物の細胞膜が生きたまま高圧力下で計測された例はこれまでなかった。そこで以降では、高圧力下における好圧性細菌 *S. violacea* DSS12 の細胞膜の物性と EPA の役割について、私たちの最近の知見に基づいて解説する。

高圧力下における蛍光偏光解消測定

前項でふれた蛍光偏光試薬 DPH やその誘導体 1-[4-(trimethylamino)pheny]-6-phenyl-1,3,5-hexatriene (TMA-DPH) は、人工膜の物性を調べるためこれまで広く用いられてきた。DPH が脂質二重層のアシル鎖尾部（膜中央部）に位置するのに対し、TMA-DPH

は末端に正電荷を持つため脂質二重層の極性頭部にアンカーされる。蛍光異方性 (fluorescence anisotropy, r) は式 [1] で定義され、膜が剛直であれば r 値は高く、乱雑さが増すとその値は低下する。

$$r = (I_{VV} - G\,I_{VH})/(I_{VV} + 2G\,I_{VH}) \quad [1]$$

ここで、I は蛍光強度、H と V は励起偏光に対しそれぞれ水平および垂直方向の蛍光成分を意味する。G は装置関数である。私たちは蛍光寿命の時間分解測定を利用し偏光解消法を行っており（以下、時間分解蛍光偏光解消法）、酵母の細胞膜エルゴステロールとその誘導体が膜におよぼす影響を調べてきた [2]。時間分解能はおよそ 100 ps である。r の時間変化は式 [2] で表される。

$$r(t) = [I_{VV}(t) - G\,I_{VH}(t)]/[I_{VV}(t) + 2G\,I_{VH}(t)] \quad [2]$$

脂質二重層に埋め込まれた分子は回転運動が制限されているので、異方性の時間変化は最も単純な一成分近似で式 [3] で表される。

$$r(t) = (r_0 - r_\infty)\ \cdot \exp(-t/\theta) + r_\infty \quad [3]$$

ここで、r_0 は蛍光分子が動いていないときの異方性、r_∞ は完全に偏光解消したときの異方性、θ は蛍光分子の回転相関時間である。重要となるのが秩序因子 (S, order parameter)と蛍光分子の回転相関係数 (D_w, rotational diffusion coefficient) であり、それぞれ式 [4]と[5]で表される。

$$S = (r_\infty / r_0)^{1/2} \quad [4]$$

$$D_w = (r_0 - r_\infty)/6\theta r_0 \quad [5]$$

膜の秩序が低下すると S は低下し、アシル鎖の回転運動が激しくなると D_w は高くなる。最近、私たちは 200 MPa までの高圧力下で時間分解蛍光偏光解消法を行うシステムを開発し、これを High-pressure time-resolved fluorescence anisotropy measurement system (HP-TRFAM) と呼んでいる [20]。図 2. にそのシステム構成を示す。そこで次に、HP-TRFAM を用いて *S. violacea* DSS12 の膜物性を解析した結果について紹介する。

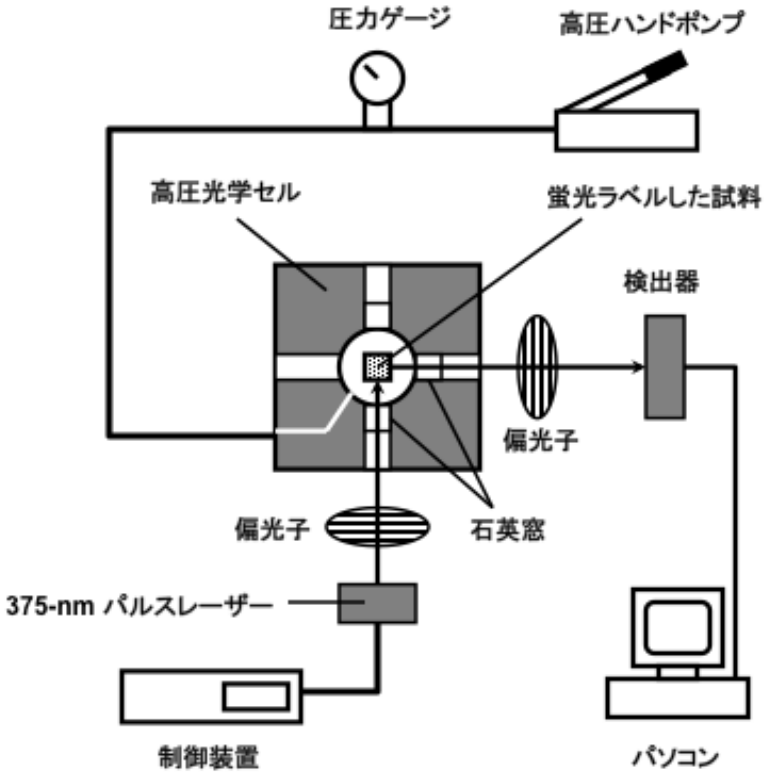

図 2. 高圧時間分解蛍光偏光解消測定システム HP-TRFAM

好圧性細菌 *S. violacea* DSS12 の細胞膜と EPA の役割

S. violacea DSS12 の野生株は 50 MPa で良好に増殖するが、Δ*pfaA* 株では増殖速度が低下する (図 3) [20]。TMA-DPH でラベルした生細胞を 10 ℃で 0.1~150 MPa の圧力下で HP-TRFAM を行った。その結果、野生株の細胞膜は大気圧下でも非常に剛直で S は 0.9 という高い値を示すことがわかった (図 4A)。大腸菌などと比べてはるかに膜の流動性は低い。しかも 150 MPa まで加圧してもこの値は大きく変化せず、野生株の細胞膜は常に剛直であるようだ [20]。EPA を失うと膜は剛直になるのかと予想していたが、逆にΔ*pfaA* 株の S は野生株よりもむしろ低い値を示した。つまり EPA がある方が膜は固いのである。(図 4A)。これを支持するように、D_w はΔ*pfaA* 株で高くアシル鎖の回転運動が高まっていた (図 4B)。

では、なぜ EPA を含む野生株の細胞膜は、EPA を含まないΔ*pfaA* 株より剛直なのだろう？実は、野生

株の全脂肪酸に占める EPA の割合は約 11%なのだが、Δ*pfaA* 株では EPA が消失するとともに、パルミトレイン酸（palmitoleic acid, C16:1）の割合が約 24%から 49%に増大していた。すなわち、EPA の欠損に伴い細胞膜脂質を構成する脂肪酸が大規模に再構築されていたのである[20]。分子シミュレーションによると、DHA（C22:6）は膜内でコイル状となり平均長が 0.82 nm なのに対し、オレイン酸（oleic acid, C18:1）では 1.42 nm と報告されている[7]。EPA も脂質二重層の表層付近でコイルのようにコンパクトな構造をとり、膜の剛直性を高めているのかもしれない。一方、倍増したパルミトレイン酸はΔ*pfaA* 株の膜をかさ高くし、剛直性の低下を引き起こしたと解釈される。ただし、Δ*pfaA* 株で膜の剛直性が低下したとはいえ、依然、37 ℃に至適増殖温度を持つような大腸菌と比べるとΔ*pfaA* 膜は圧倒的に固い。従って、ある微生物において脂質組成が少なからず変化しても、特定の範囲内で膜物性が維持されていれば死なずに生きていられる、といった解釈もあろう。

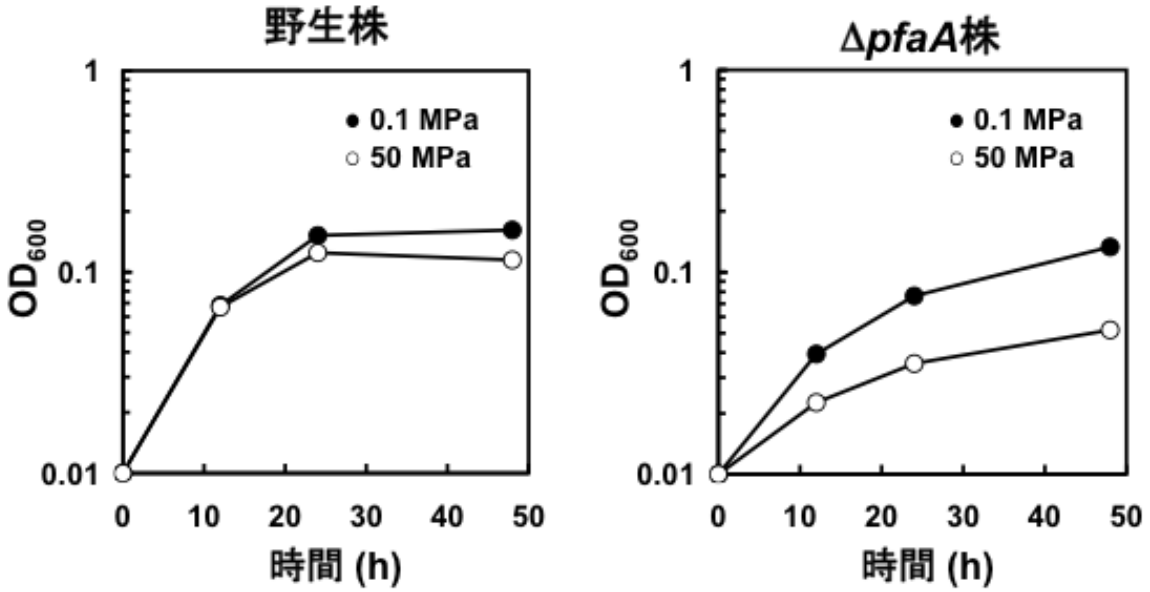

図 3. *S. violacea* の野生株とΔ*pfaA* 株の高圧下における増殖

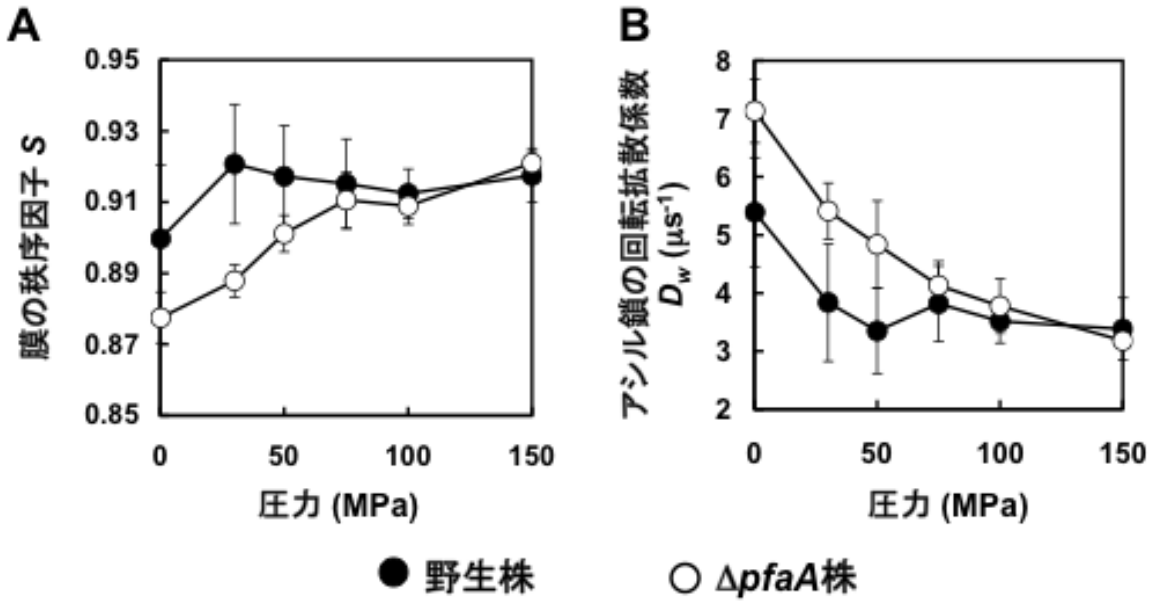

図 4. *S. violacea* の野生株とΔ*pfaA* 株の高圧下における膜物性
(A) 膜の秩序因子 *S* の圧力依存性 (B) 脂質アシル鎖の回転拡散係数 D_w の圧力依存性

6. “膜の流動性”が持つ意味

Homeoviscous adaptation は、高圧力や低温環境でも膜の粘性（流動性）を一定に保つ適応を意味し、一般にアシル鎖の不飽和度で論じられる。深海に棲む好圧性細菌であるがゆえ、*S. violacea* DSS12 の細胞膜はさぞ流動性に富むに違いないと考えられてきた。ところが HP-TRFAM による私たちの測定は、*S. violacea* DSS12 の膜が非常に剛直で流動性に乏しいことを明らかにした。実際に測定してみて初めてわかったことである。さらにその膜の状態は 150 MPa まで加圧してもさほど変化しない。従って、膜流動性の絶対値が重要なのではなく､圧力をかけても“膜が剛直のままそれ以上変化しない”ことの方が意味を持つのでないかと私たちは考えている。こうしたコンセプトが果たして普遍的なのか、今後、深海由来の様々な微生物細胞膜を HP-TRFAM で解析することで答えが見つかるに違いない。しかしながら、まだ本質的な問題が残されている。それは、膜を特徴づける秩序因子 S や回転拡散係数 D_w、さらにそれらの圧力依存性が、実際にどういった生物機能と直接リンクしているのか、例えば栄養源輸送体の活性やイオンチャネルの機能なのか、膜を介する物質の単純拡散なのか、あるいは細胞分裂装置の機能なのか、それらを識別する多面的なアプローチが今後必要であろう。

謝辞

本研究は主に独立行政法人海洋研究開発機構で行われたものです。共同研究者の臼井けい子氏、開俊樹博士、加藤千明博士、能木裕一博士、ならびに京都大学化学研究所の川本純博士と栗原達夫博士、装置開発においてはシン・コーポレーション社の松本雅光博士と永澤眞氏、そして、膜物性に関する有益なご助言を頂いた徳島大学の松木均博士と金品昌志博士に感謝申し上げます。なお、本ミニレビューは「高圧力の科学と技術」誌で現在印刷中の筆者の総説「高圧力下における微生物細胞膜の動的構造」を元に編集し執筆したものです。

参考文献

1) Abe, F., Iida, H. 2003. Pressure-induced differential regulation of the two tryptophan permeases Tat1 and Tat2 by ubiquitin ligase Rsp5 and its binding proteins, Bul1 and Bul2. Mol. Cell. Biol. 23: 7566–7584.
2) Abe, F, Hiraki, T. 2009. Mechanistic role of ergosterol in membrane rigidity and cycloheximide resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim Biophys Acta. 1788: 743–752
3) Allen, E.E., Facciotti, D., Bartlett, D.H. 1999. Monounsaturated but not polyunsaturated fatty acids are required for growth of the deep-sea bacterium *Photobacterium profundum* SS9 at high pressure and low temperature. Appl. Environ. Microbiol. 65: 1710–1720.
4) Aono, E., Baba, T., Ara, T., Nishi, T., Nakamichi, T., Inamoto, E., Toyonaga, H., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Tomita, M., Kato, C., Oshima, T., Nakasone, K., Mori, H. 2010. Complete genome sequence and comparative analysis of *Shewanella violacea*, a psychrophilic and piezophilic bacterium from deep sea floor sediments. Mol. Biosyst. 6: 1216–1226.
5) Balny, C., Masson, P., Heremans, K. 2002. High pressure effects on biological macromolecules: from structural changes to alteration of cellular processes. Biochim. Biophys. Acta. 1595: 3–10
6) Behan, M.K., Macdonald, A.G., Jones, G.R., Cossins, A.R. 1992. Homeoviscous adaptation under pressure: the pressure dependence of membrane order in brain myelin membranes of deep-sea fish. Biochim. Biophys. Acta 1103: 317–323
7) Fernandes, M.X., de la Torre, J.G. 2002. Brownian dynamics simulation of rigid particles of arbitrary shape in external fields. Biophys. J. 83: 3039–3048.
8) Gekko, K. 2002. Compressibility gives new insight into protein dynamics and enzyme function. Biochim. Biophys. Acta. 1595: 382–386
9) Kaneshina, S., Ichimori, H., Hata, T., Matsuki, H. 1998. Barotropic phase transitions of dioleoylphosphatidylcholine and stearoyl-oleoylphosphatidylcholine bilayer membranes. Biochim. Biophys. Acta. 1374: 1–8.
10) Kawamoto, J., Kurihara, T., Yamamoto, K., Nagayasu, M., Tani, Y., Mihara, H., Hosokawa, M., Baba, T., Sato, S.B., Esaki, N. 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
11) Kawamoto, J., Sato, T., Nakasone, K., Kato, C., Mihara, H., Esaki, N., Kurihara, T. 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. 13: 2293–2298.
12) Kawano, H., Nakasone, K., Matsumoto, M., Yoshida, Y., Usami, R., Kato, C., Abe, F. 2004.

Differential pressure resistance in the activity of RNA polymerase isolated from *Shewanella violacea* and *Escherichia coli*. Extremophiles 8: 367–375.

13) Marquis, R.E. 1976. High-pressure microbial physiology. Adv. Microb. Physiol.14: 159–241.

14) Li, H., Akasaka, K. 2006. Conformational fluctuations of proteins revealed by variable pressure NMR. Biochim. Biophys. Acta.1764: 331–345

15) Macdonald, A.G. 2002. Ion channels under high pressure. Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. 131: 587–593.

16) Macgregor, R.B. Jr. 1998. Effect of hydrostatic pressure on nucleic acids. Biopolymers 48: 253–263.

17) Pande, C., Wishnia, A. 1986. Pressure dependence of equilibria and kinetics of *Escherichia coli* ribosomal subunit association. J. Biol. Chem. 261: 6272–6278.

18) Salmon, E.D. 1975. Pressure-induced depolymerization of brain microtubules in vitro. Science 189: 884–886.

19) Somero, G.N. 1992. Adaptations to high hydrostatic pressure. Annu. Rev. Physiol. 54: 557–577.

20) Usui, K., Hiraki, T., Kawamoto, J., Kurihara, T., Nogi, Y., Kato, C., Abe, F. 2012. Eicosapentaenoic acid plays a role in stabilizing dynamic membrane structure in the deep-sea piezophile *Shewanella violacea*: a study employing high-pressure time-resolved fluorescence anisotropy measurement. Biochim. Biophys. Acta. 1818: 574–583.

21) Vezzi, A., Campanaro, S., D'Angelo, M., Simonato, F., Vitulo, N., Lauro, F.M., Cestaro, A., Malacrida, G., Simionati, B., Cannata, N., Romualdi, C., Bartlett, D.H., Valle, G. 2005. Life at depth: *Photobacterium profundum* genome sequence and expression analysis. Science 307: 1459–1461.

22) Yayanos, A.A, Pollard, E.C. 1969. A study of the effects of hydrostatic pressure on macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. Biophys. J. 9: 1464–1482.

23) Yayanos, A.A., Dietz, A.S., Van Boxtel, R. 1979. Isolation of a deep-sea barophilic bacterium and some of its growth characteristics. Science 205: 808–810.

MINI REVIEW

Journal of Japanese Society for Extremophiles (2012) Vol.11, 90-95

Honda K.[a,b]

Construction of synthetic metabolic pathways using thermo-tolerant biocatalytic modules

耐熱性酵素モジュールを用いた合成代謝工学への挑戦

大阪大学大学院工学研究科、JST さきがけ
本田 孝祐

[a] Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan
[b] JST PRESTO

Corresponding author: **Kohsuke Honda**, honda@bio.eng.osaka-u.ac.jp
Phone: +81-6-6879-7438, Fax: +81-6-6879-7439

Received: September 13, 2012 / Accepted: November 6, 2012

Abstract Metabolic engineering has emerged as a practical alternative to conventional chemical conversion particularly for biocommodity production processes. However, this approach is often hampered by as yet unidentified inherent mechanisms of natural metabolism. To overcome this limitation, we developed a novel, simple technology, designated as synthetic metabolic engineering, for freely designing a chimeric metabolic pathway. In this technology, genes encoding thermophilic enzymes were overexpressed in a mesophilic host (*e.g., Escherichia coli*), and the recombinant cells were heated to inactivate mesophilic indigenous enzymes. These operations enable a one-step preparation of highly selective and stable biocatalytic modules, and an *in vitro* synthetic metabolic pathway can be readily constructed through the rational combination of these modules. Owing to their independence from biological activities of living cells, synthetic pathways no longer play physiological roles in natural metabolism involving the energy generation and energy-consuming synthesis of biomolecules; thus, the bespoke pathway specialized for chemical conversion can be designed. In this mini-review, several examples of the chemical production systems developed using synthetic metabolic engineering are shown and the feasibility of this new technology is discussed.

Keywords: synthetic metabolic engineering, pathway design, thermo-tolerant enzyme, thermophile, archaea,

１．はじめに

バイオ燃料生産を含む各種発酵生産プロセスの高効率化を目指すうえで、代謝工学を利用した微生物ゲノムの改変は、今や欠かすことのできない研究・開発戦略のひとつとなりつつある [8)]。その一方、代謝工学的手法に基づき設計・導入した改変が、期待どおりの生産性向上に結び付かないという事例も少なくない。改めて考えてみればにべもないことだが、微生物にとって最も重要なタスクとは、エタノール生産でもアミノ酸発酵でもなく、自身が置かれた環境下でいかに生存・増殖を維持するかにある。したがって、われわれが特定の代謝産物の生産性増大を目論んで微生物ゲノムに人為的改変を加えようとも、その改変が彼らの生存・増殖にとって不利に働くものであった場合、何らかのセーフティーネットワークが発動し、改変の効果が打ち消されることがある。発展著しい各種の-omics 技術を駆使し、いわゆる「生命のロバスト性」の原因となっている一連のネットワークをより深く理解し制御しようという試みが、近年の代謝工学分野における潮流のひとつとなっている [5)]。

一方、著者らのグループでは、生きた細胞の代謝経路を改変するのではなく、モジュール化した代謝酵素を *in vitro* で任意に組み合わせ、物質生産に特化した経路を再構築することで、既存の代謝工学が抱える問題を克服することを試みている。

２．合成代謝工学

後述するように、単離酵素を組み合わせた *in vitro* での代謝経路の構築とこれを用いた物質生産の例は

これまでにも多くの報告がなされている。しかし、ここで問題となるのは複数の代謝酵素を副反応を伴わないレベルにまで精製する作業の煩雑さにある。筆者らはこの煩雑さを回避するため、(超) 好熱菌に由来する耐熱性酵素遺伝子に着目した。まず、耐熱性酵素遺伝子を大腸菌などの中温性宿主微生物内で過剰発現させる。得られた組換え菌を 70°C 程度の熱処理に供した後、触媒としてそのまま利用する。この結果、宿主由来酵素の大部分が熱変性により不可逆的に失活し、精製酵素と同レベルの高い選択性を有した生体触媒が容易に得られる。また多くの中温性微生物の細胞外膜構造は熱処理により脆弱化されるため、微生物変換反応でしばしば問題となる基質・生成物の膜透過律速が解消される。本アプローチは異種宿主内での機能的発現さえ可能であれば、あらゆる耐熱性酵素に対して適用可能である。従って代謝経路を構築する一連の耐熱性酵素をモジュール化し、これらを任意に組み合わせることによって化学品生産のための人工代謝経路をオンデマンドで構築することが可能なる(図１)。例えて言うなれば、従来の代謝工学が、既存の地図（代謝経路）の上に新たな道を書き足したり、あるいは不要な横道を消し去ることで出発地（基質）から目的地（生産物）への経路を最短化する手法だとするならば、本法は白紙のキャンバス上にフリーハンドで新たな地図をデザインしようというものである。著者らのグループでは、本法を「合成代謝工学」と名付け、様々な化学品生産への適用を試みている。本稿では、われわれがこれまでに取り組んだ合成代謝工学によるものづくりの事例を紹介し、その可能性と今後取り組むべき課題について議論をしたい。

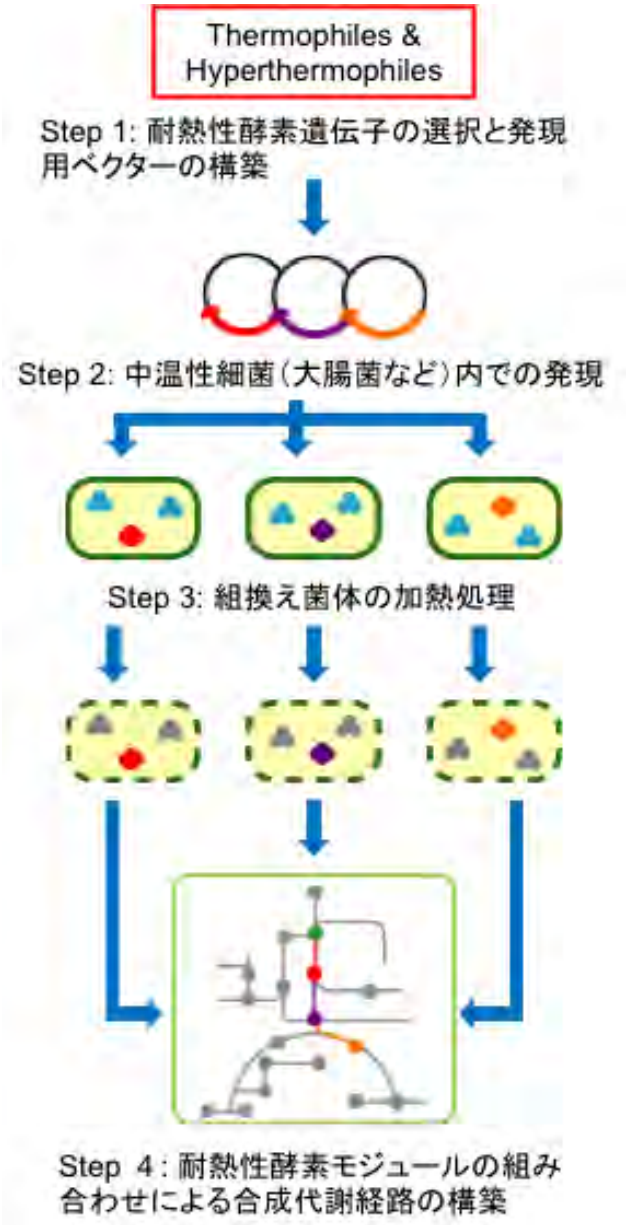

図１　合成代謝工学の技術概要.

３．合成代謝工学による核酸合成中間体の生産

DNA の生合成はグルコースを出発物質とした場合、リボース骨格の合成とその還元を含む 20 種類以上の酵素反応が関与する複雑な合成経路を経る。一方、通常の生細胞内ではマイナー経路としてしか機能していないものの、これとは全く異なる経路としてデオキシリボースアルドラーゼ（DERA）が触媒するグリセロアルデヒド-3-リン酸（GAP）とアセトアルデヒドのアルドール縮合によるデオキシ骨格の直接形成を経る合成経路が知られている。本経路はリボースを経る「メジャー経路」に比べて少数の酵素群（11 種類）によって構成されている。所望の代謝経路を自在に再構築できる合成代謝工学的アプローチを持ってすれば、このようなマイナー経路を積極的に活用した物質生産が可能となる。

研究開始当時、すでに中温性 DERA を過剰発現させた大腸菌と GAP 供給源として酵母の解糖系をカップリングすることにより、核酸合成中間体である 2'-デオキシリボース 5-リン酸（DR5P）を生産させる手法が報告されていたが [2]、われわれもこれにならい同経路を構築する必要最小限の耐熱性酵素からなる合成代謝経路を構築し DR5P 生産実験を行った [1]。ポリリン酸から ADP へのリン酸基転移反応を触媒する耐熱性ポリリン酸キナーゼ（PPK）を用いた ATP 再生系 [3]の存在下で、DERA を含む 5 種の酵素群をアッセンブルし、フルクトースからの DR5P 生産経路を構築した（図 2）。当初、各酵素の最適反応温度に則し、70°C での反応を実施したところ、反応開始から 30 分間で 10 mM のフルクトースから 1.2 mM 程度の DR5P の生産が確認された。しかし、これらは時間の経過とともに減少し、反応開始から 2 時間ほどで検出限界を下回った。これは代謝経路の中間体である GAP およびその異性体であるジヒドロキシアセトンリン酸（DHAP）が熱に対して不安定であることに起因する。DERA により触媒される反応は可逆的に進行するため、GAP の熱分解に伴い、反応平衡がアルドール分解反応側にシフトし、代謝フローの逆流が生じてしまう。このため生産実験は PPK と 2 種類のキナーゼによるフルクトース 1,6-ビスリン酸（FBP）の生産までを 70°C で行った後、残りの酵素モジュールを添加し、30°C にて引き続き反応を実施するという 2 段階に分けて実施した。この結果、10 mM のフルクトースから 5.5 mM の DR5P を生産することが可能であった。

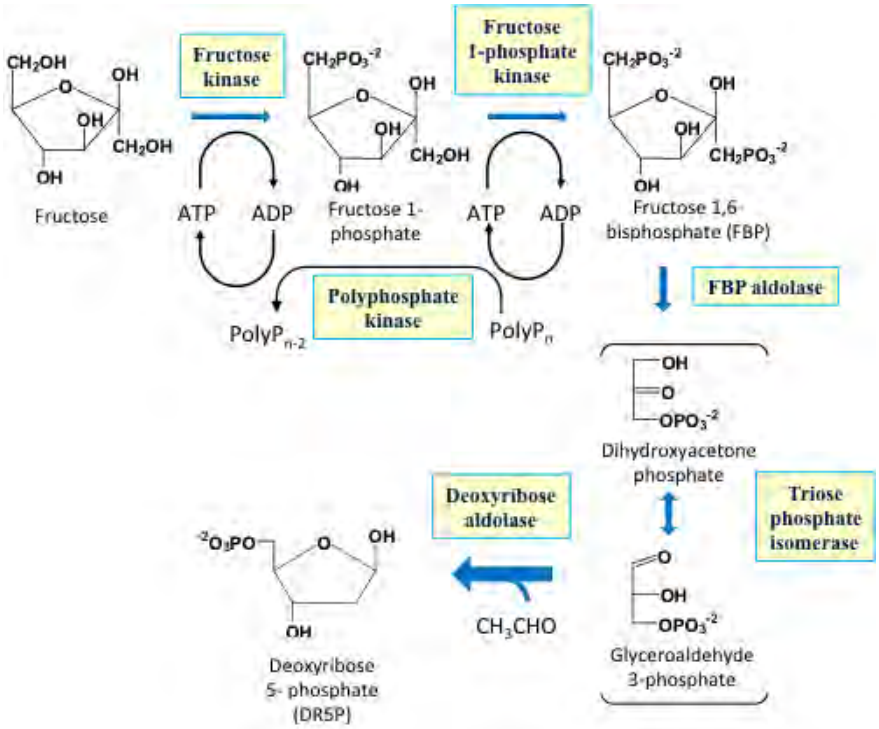

図 2　フルクトースからの DR5P 生産のための合成経路デザイン [1].

４．合成代謝工学によるキメラ型解糖系の構築

上でも述べたが、単離酵素を用いた *in vitro* での代謝経路の再構築とこれを用いた物質生産の試みは、これまでにも数多くの報告がなされている。古くは 1985 年に Welch と Scopes によって報じられた酵母由来の解糖系酵素群および ATPase を用いたグルコースからのエタノール生産の例が挙げられる [9]。本報告によれば、1 M（18%）のグルコースから 8 時間の反応で、理論収率である 2 M（9%）に迫るエタノールを生産することに成功しており、反応速度と対基質収率のみで比較すれば、通常の発酵法を凌駕する生産性が得られている。また近年では、岩田と奥により耐熱性酵素を用いたエタノール生産が報告されている [4]。好熱菌を遺伝子ソースとすることで、酵素の安定性が格段に増したことに加え、精製ステップを大幅に簡略化させることが可能となっており、

このアイデアは我々の技術を立案する上でも欠かせないものであった。本系は余剰 ATP の再生反応を含まないため、高濃度基質の利用には適さないが、5 mM のグルコースから 9 mM 程度のエタノール生産が可能であり、対基質収率の高さは Welch と Scopes のシステムと同等である。

ただし、これらの報告例で再構築された代謝経路は、いずれも天然のエタノール発酵経路をそのまま模倣したものである。代謝の生理的意義が ATP や NAD(P)H などの補酵素を通貨としたエネルギーや還元力の獲得（異化代謝）ならびに、ここで得られたエネルギーを利用した細胞構成物質の合成（同化代謝）にある点を考慮すれば、天然の代謝経路の一部を無作為に「コピー&ペースト」しただけの合成経路では、補酵素の過不足による反応停止が避けられないことは自明である。PPK や ATPase などの適当な補酵素再生用酵素反応とのカップリングも一つの解決策といえるが、微生物の代謝酵素の多様性を活用すれば、これらの方法に頼らなくとも補酵素収支の問題を克服することが可能となる。例えばグルコースからのエタノール生産経路の場合、真核・原核生物における Embden-Meyerhof（EM）経路を経ればグルコース 1 分子あたり 2 分子の ATP が生産される（すなわち ADP 2 分子が消費される）。一方、一部のアーキアには ADP 依存型キナーゼなどユニークな補酵素要求性を有した真核・原核生物には見られない酵素からなる変形 EM 経路の存在が知られている [7]。原核・真核生物型 EM 経路において GAP から 3-ホスホグリセリン酸（3-PG）への変換は、GAP デヒドロゲナーゼ（GAPDH）によるリン酸依存型の脱水素反応とホスホグリセリン酸キナーゼ（PGK）による脱リン酸化反応の 2 段階から成り立っており、この一連の反応で GAP 1 分子あたり 1 分子の ATP が産生される。これに対し、一部のアーキアは、リン酸非依存的に GAP を脱水素する GAP フェレドキシン酸化還元酵素（GAPOR）や non-phosphorylating GAPDH（GAPN）により GAP から 1 段階の反応で直接 3-PG への変換を行う。GAPN が触媒する反応では ATP 生産は伴わないため、原核・真核生物型 EM 経路中の GAPDH および PGK をアーキア由来の GAPOR や GAPN に置換することで ATP 収支の合致したキメラ型 EM 経路を構築することが可能となる（図 3）。

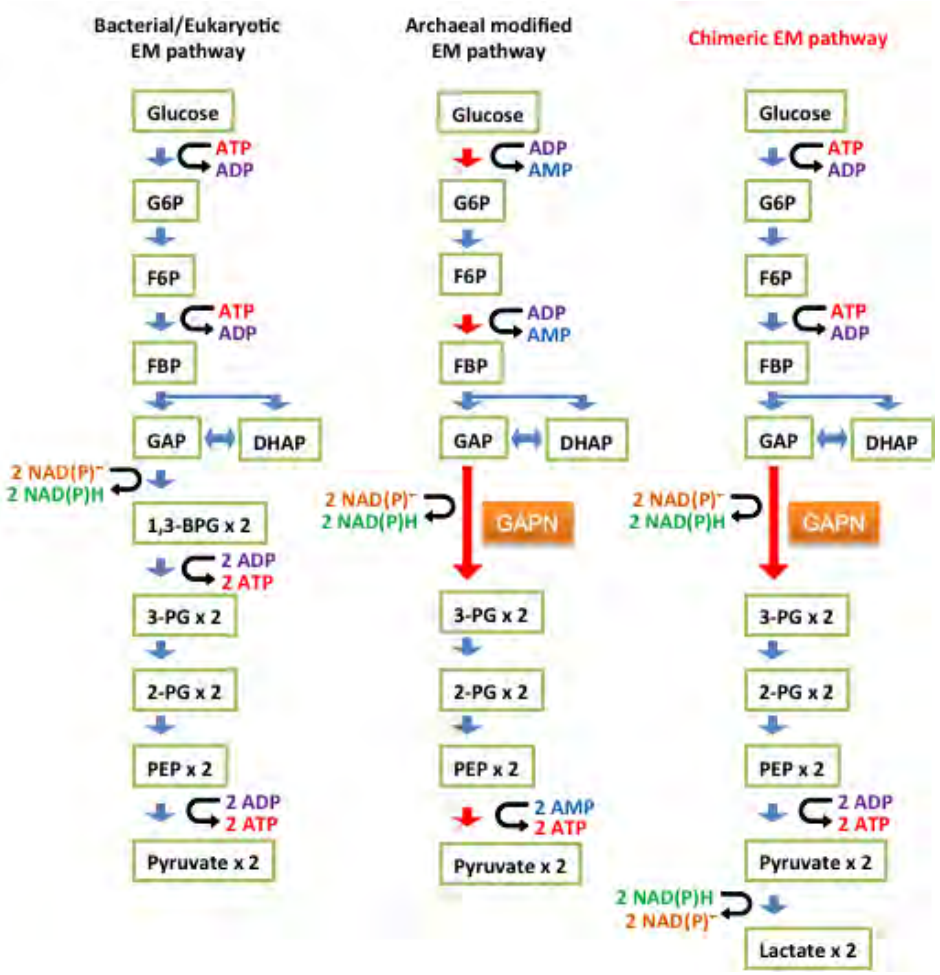

図 3　キメラ型解糖系のデザイン．真核/原核生物型 EM 経路（左）、アーキア型変形 EM 経路（中）、および筆者らが構築したキメラ型 EM 経路（右）。変形 EM 経路に特徴的な酵素反応を赤矢印で示した．

ここで重要となるのは、このようなキメラ型経路は合成代謝工学的手法を用いなければ構築できない点にある。言うまでもなく、EM 経路は、最もよく研究された、そして生物にとって最も重要な代謝経路のひとつであり、基質（グルコース）が有する自由生成エネルギーをATPの形で取り出すことを生理的役割としている。すなわち、ATP 収支の合致した（ATP を生産しない）EM 経路は、もはやその生理的役割を失っており、このようなキメラ型経路を生きた微生物内で再構築するということは、取りも直さず当該微生物の EM 経路の機能を無効化することに他ならないからである。

筆者らは、*Thermococcus kodakarensis* 由来の GAPN [6]ならびに *Thermus thermophilus* 由来の原核生物型 EM 経路酵素群を組み合わせたキメラ型 EM 経路を構築し、これを用いたグルコースからの乳酸生産に取り組んだ [10]。なお、本経路の最終ステップとなるピルビン酸から乳酸への NADH 依存的還元反応は通常、乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH）によって触媒されるが、*Thermus thermophilus* 由来耐熱性LDHは、比較的低濃度（0.5 mM 以上）の NAD^+存在下で強く阻害を受け、同経路内ではほとんど機能しないことが明らかとなった。そこで演者らは、同細菌より NAD^+による阻害作用を被ることなく LDH と同様の反応を触媒可能な別の酵素を探索し、リンゴ酸/乳酸デヒドロゲナーゼ（MLDH）を選抜した。生きた細胞を用いない合成代謝工学では、転写・翻訳レベルでの調節作用に左右されない物質生産が可能であることは言うまでもないが、このように異なる代謝経路（あるいは異なる微生物）に由来する酵素をアッセンブルすることによりタンパク質レベルで作用するアロステリック調節をも回避できる点には着目すべきである。

こうして構築されたキメラ型 EM 経路を用いて、生産実験を行ったところ、反応開始から 5 時間程度まで継続的な乳酸の蓄積が認められた（図 4）。その後、生産速度ならびにモル収率の低下が認められたが、これは酵素の失活によるものではなく、補酵素である NAD^+および NADH の熱分解に起因することが明らかとなった。反応開始 5 時間後に 1 mM の NADH を再添加することにより、反応速度は回復し、10 時間の反応で 6 mM のグルコースからモル収率 100%の変換、すなわち 12 mM の乳酸を得ることが可能となった。この際、経路内での ATP ターンオーバー数は 31 と算出された。

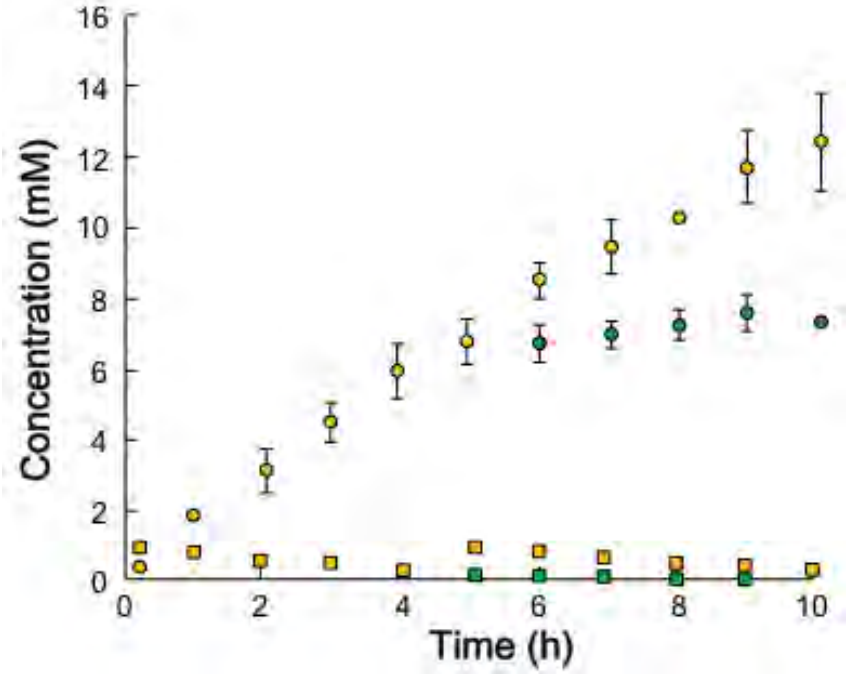

図 4　キメラ型解糖系を用いたグルコースからの乳酸生産 [10]. 乳酸（○）および NAD^+/NADH の総濃度（□）の経時変化を示した．反応開始 5 時間後に 1 mM NADH を添加した場合をオレンジ、不添加の場合を緑で示した.

５．おわりに

以上の研究成果を通じて、代謝経路のフリーデザインや副産物を伴わない（すなわちモル収率 100%での）物質生産が可能となる、といった基幹コンセプトがおおむね実証された反面、各研究事例における最終生産物濃度などからもおわかりいただけるとおり、化学品生産技術としての合成代謝工学の力価は、まだまだ産業応用可能なレベルには程遠い。そこで本稿の最後に、合成代謝工学のパフォーマンスを実用レベルにまで押し上げるため、今後われわれが取り組むべき課題について触れたい。

今回紹介した研究事例では、複数の耐熱性酵素モジュールを組み合わせる際、各酵素遺伝子を個別に発現させた組換え大腸菌を混合して使用した。この

方策を取ることによって、個々の酵素活性レベルのファインチューニングが可能となる反面、構築したい代謝経路が複雑になるほど培養・集菌にかかる手間が煩雑となる。これに対し、必要な耐熱性酵素遺伝子群を共発現させた組換え株を触媒として用いることができれば、培養に要する手間を軽減するのみならず、必要な酵素を細胞内という微小な空間内に偏在させることにより、代謝中間体の拡散距離を縮め、総括の反応速度を高める、いわゆる ”spatial organization” が可能になると期待できる。

また、キメラ型解糖系による乳酸生産の過程で明らかになった補酵素の熱分解の問題は、「(超) 好熱菌はいかにしてこれらの物質の細胞内濃度を保っているのだろうか？」という新たな疑問をわれわれに提示するものだともいえる。微生物の生育温度とこれらの細胞内における補酵素生合成速度には相関があるのだろうか？あるいは、好熱菌には、未知の補酵素安定化因子が存在するのだろうか？これらの点についてより深い知見が得られれば、合成代謝工学のフィージビリティーを向上させる上でも大きな一歩となるはずである。

そして、アーキアの変形 EM 経路中の酵素群がキメラ型解糖系構築のためのキーツールとなったように、現在も精力的に進められる好熱菌の代謝経路およびそれをつかさどる耐熱性酵素群の特性評価とライブラリー化が、合成代謝工学による、より多様で自在な代謝経路デザインに欠かせないことは言うまでもなかろう。

【引用文献】

1) Honda, K., Maya, S., Omasa, T., Hirota, R., Kuroda, A., and Ohtake, H. 2010 Production of 2-deoxyribose 5-phosphate from fructose to demonstrate a potential of artificial bio-synthetic pathway using thermophilic enzymes. J. Biotechnol. 148: 204-207.
2) Horinouchi, N., Ogawa, J., Sakai, T., Kawano, T., Matsumoto, S., Sasaki, M., Mikami, Y., and Shimizu, S. 2003 Construction of deoxyriboaldolase-overexpressing *Escherichia coli* and its application to 2-deoxyribose 5-phosphate synthesis from glucose and acetaldehyde for 2’-deoxyribonucleoside production. Appl. Environ. Microbiol. 69: 3791-3797.
3) Iwamoto, S., Motomura, K., Shinoda, Y., Urata, M., Kato, J., Takiguchi, N., Ohtake, H., Hirota, R., and Kuroda, A. 2007 Use of an *Escherichia coli* recombinant producing thermostable polyphosphate kinase as an ATP regenerator to produce fructose 1,6-diphosphate. Appl. Environ. Microbiol. 73: 5676-5678.
4) 岩田英之. 2010. 耐熱性酵素を用いた無細胞エタノール生産系の構築. pp. 180-187 植田充美監修, 合成生物工学の隆起, シーエムシー出版
5) Lee, J. W., Kim, T. Y., Jang, Y. S., Choi, S., and Lee, S. Y. 2011 Systems metabolic engineering for chemicals and materials. Trends Biotechnol. 29: 370-378.
6) 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-phospho-glycerate. Mol. Microbiol. 81: 1300-1312.
7) 大島敏久, 櫻庭春彦 2009 超好熱性アーキアのユニークな糖代謝系. 蛋白質 核酸 酵素, 54: 134-140.
8) Stephanopoulos, G., and Sinskey, A. J. 1993 Metabolic engineering -methodologies and future prospects. Trends Biotechnol. 11: 392-396.
9) Welch, P., and Scopes, R. K. 1985 Studies on cell-free metabolism: Ethanol production by a yeast glycolytic system reconstituted from purified enzymes. J. Biotechnol. 2:257-273.
10) Ye, X., Honda, K., Sakai, T., Okano, K., Omasa, T., Hirota, R., Kuroda, A., and Ohtake, H. 2012 Synthetic metabolic engineering –a novel, simple technology for designing a chimeric metabolic pathway. Microb. Cell Fact. 11: 120.

MINI REVIEW

Journal of Japanese Society for Extremophiles (2012) Vol.11, 96-104

Takai K.

What is life?
Lesson from boundary between the habitable and the uninhabitable in the Earth

生命とは何か？−生命（圏）の限界から考える−

独立行政法人海洋研究開発機構　海洋・極限環境生物圏領域
およびプレカンブリアンエコシステムラボ
高井 研

Subsurface Geobiology Advanced Research (SUGAR) Project and Precambrian Ecosystem Laboratory (PEL),
Japan Agency for Marine-Earth Science & Technology (JAMSTEC), 2-15 Natsushima-cho, Yokosuka 237-0061, Japan

Corresponding author: Ken Takai, kent@jamstec.go.jp
Phone: +81-46-867-9677, Fax: +81-46-867-9715

Received: October 29, 2012 / Accepted: November 7, 2012

Abstract I believe that one of the fundamental goals in research on extremophiles is to have a general principle explaining the question, 'what is life?'. Extremophiles living in certain boundary biospheres, biospheres present in fringes between habitable and uninhabitable environments in this planet, have greater potentials to originate, proliferate, evolve, survive and propagate in potentially habitable environments in extraterrestrial bodies and moons in the Universe. Thus, if we have chances to find such extraterrestrial extremophiles in the future, comparative studies between the terrestrial and the extraterrestrial extremophiles will provide a revolutionary insight into understanding what life is. However, we should establish certain definitions and criteria to perceive existence and function of life in future extraterrestrial life exploration. Of particular, concepts for limits of life and biospheres and habitability in this planet build the basis. Here, I overview recent progress in extremophiles' research to extend our view on limits of life and biosphere in this planet. In addition, a currently proposed energy mass balance concept of habitability and the subsequent several estimations for the realistic minimal energy quantum and quantity to sustain the terrestrial lives are introduced. At last, the difficulties that we now encounter and the future prospects are discussed.

Keywords: Extremophiles, limits of life, limits of biosphere, energy mass balance, Astrobiology
キーワード：極限環境生物、生命の限界、生命圏の限界、エネルギー論、宇宙生物学

緒言

アリストテレスに始まるとされる、我々自身を含めた地球に生き永らえるモノ、つまり生物—を理解しようとする知の体系としての「生物学」が、解き明かそうとする究極的な到達点の一つは、「生命とは何か」という問いに対して、科学的な一般性原理としての答えを提示することであろう。そしてその答えに到達しようとすることは、生物学だけに留まらず、あらゆる科学における、さらには人間の知的好奇心の根源的な欲求に基づいた一つの知の目標と言えるのではないだろうか。しかし一方で、その命題に対する科学アプローチが抽象的かつ観念論的な概念や考察に留まる限りにおいては、知的好奇心の躍動感や魅力を失ってしまう可能性も否定できない。

つまり著者は、「生命とは何か」という問いに答える科学を強力に推進するためには、観念論的な概念とともに、比較的わかりやすい検証すべき仮説に基づいた実現可能かつ魅力的な研究テーマやプロジェクトが必要ではないかと考える。そのような観点から俯瞰すれば、地球における生命が存在できないように見える極限的な環境において、生命活動を存続する生物、つまり極限環境生物—の研究は、「生命とは何か」を考える上で一つの具体的な手がかりになる「生命の限界」に対する本質的理解を与える事ができる研究分野と言えよう。

また我々が唯一知っている「地球生命」だけでなく、おそらく宇宙においても幾多に存在すると考えられる地球外生命のあり方との比較を通じて、「生命とは何か」を理解しようとする「太陽系における地球外生命探査」に代表されるようなアストロバイオ

ロジーという新しい研究領域は、科学的にも社会的にも極めて求心力に富んだ研究分野としてのポテンシャルを秘めている。実際にこれまでの科学的成果に基づいた具体的な地球外生命探査計画として、世界各国で、火星、木星の衛星であるユーロパ、土星の衛星エンセラダス・タイタン、の生命探査が推進、展開され、大きな注目を浴びている。いずれの候補環境においても、その作業仮説の基盤は、(1)生命現象を支える自由エネルギーが十分に存在している（いた）こと、そして(2)空間的・時間的なエネルギーポテンシャルを形成する「区切り構造(compartment)」や多様な無機物や有機物及びその化学反応を支える「溶媒(solvent)」が十分に存在している（いた）こと、が想定されている。そして「溶媒」に関しては、タイタンを除いては、「液体の水」が前提条件として挙げられている。

つまり、太陽系における地球外生命探査とは、「自由エネルギー」と「液体の水」の存在を地球外生命存在の前提条件として捉えていると言ってよい。そしてそれは地球の極限環境に生息する生物の研究によって積み上げられてきた地球生命存在の必要最低前提条件である。もちろん地球外生命存在条件は、地球極限環境生物の存在可能条件よりも大きなポテンシャルを有している可能性が十分考えられる。しかし同時に極限環境生物を含めた地球生命は、おそらく宇宙生命としては例外的に繁栄・持続している成功例の一つであり、それが宇宙において極めて希な特殊な生命システムを基盤としている、と考える必然性は極めて低い。むしろ地球生命の存在可能条件は、宇宙における生命存在条件の基盤となると考える方が遥かに理にかなっている。

このような観点から、本ミニレビューでは極限環境やそこに生息する生物の研究を通じて見えてきた地球の生命存在条件の境界について概説したい。これまで地球や宇宙における生命存在領域を探ろうとする研究は、二つの側面から進められてきた。一つは地球における生命活動の限界(limits of life)を見極め、その生命生育環境の限界(limits of biosphere)から生命存在可能環境を探ろうとするアプローチであり、もう一つは、地球における生命存在条件(habitability)というものを物理・化学的に規定し、その物理・化学条件を満たす環境を探ろうとするアプローチである。この二つのアプローチによって見えてきた地球生命存在条件の最新像に迫ってみよう。

地球における生命存在限界

地球における生命活動は極めて多くの要因の相互作用によって規定されるものではあるが、現実の地球環境ではすでに多くの要因がすでに生命存在可能条件の範囲内にあり、その生命活動や生育環境の限界を規定する要因が無数にあるということはないだろう。実際我々が直接観察できる地球表層環境（深海や地殻上部も含めて）においては、むしろ全く生命活動がない、あるいは生物そのものや生命活動の痕跡物質が含まれないような生命非存在環境を探すほうが遙かに難しい。地球外生命存在の必要最低前提条件が「自由エネルギー」と「液体の水」の存在であると仮定した場合、どちらも地球表層環境において豊富に存在する条件である。それ以外の極めて決定的な条件としては、温度、圧力といった物理的条件や pH、塩濃度といった化学的条件を挙げることができる。地球における生命活動の限界を述べる前に、まず生命にとって利用可能な「液体の水」が存在しうる極限的な物理・化学条件環境を考えてみる。

表 1 には、地球においてこれまでに確認された液体の水が生物にとって利用可能な環境における温度、圧力、pH、塩濃度の条件の極限環境例が示されている [36]。これまでに知られる地球環境環境における液体の水の最高温度は 407 °C であり、大西洋中央海嶺に見つかった深海熱水噴出孔から噴出する熱水の温度である。この温度は海水の臨界点温度(407 °C)であり [3]、液体の水の理論的最高温度と言える。低温側は氷点下では存在する水のほとんどが固体になってしまうので液体の水の利用が極めて困難になるが、氷中においてもわずかな液体の水の利用可能性が考えられており、極限環境としては記録が残っている測定最低気温を挙げた。圧力について確認された自然環境の最大限界は、マリアナ海溝チャレンジャー海淵の堆積物環境の 110 MPa である [16]。低圧側は、宇宙と地球の大気圏の境界である成層圏上限の気圧を示す。pH については、マリアナ前弧域南チャモロ海山の蛇紋岩流体が pH 12.5 を示し、その強アルカリ性流体が極めて大きな海底下空間を占めていることが知られる [32]。陸域では、北ヨルダンのマカリンに分布する高温変成作用を受けたビチューメン質泥灰岩・石灰岩地帯において、pH 12.9 の天然のセメント地下水の湧出が認められており、地下で比較的大きな空間を形成していることが知られる [27]。酸性側では、世界各地で pH 0 の温泉が知られている [34]だけでなく、アメリカのカリフォルニア州の地下鉱山跡の鉱脈地下排水が pH -3.6 というマイナス値を示すことが知られている [22, 23]。塩濃度では、飽和塩分濃度を超えた塩湖が世界中に存在し、塩をほぼ全く含まない純水環境もありふれて存在する。その他、表 1 には示していないが様々な物理・化学条件での極限環境が考えられる。

表 1　地球における液体の水が存在しうる極限環境と生命の存在が検出されうる極限環境

物理・化学要因	液体の水が存在しうる極限環境	生命の存在が検出されうる極限環境
低温	南極ボストーク基地-89 ˚Cの氷	氷床の氷中
高温	407 ˚Cの大西洋中央海嶺深海熱水	365 ˚Cの中央インド洋海嶺深海熱水
低圧	成層圏の氷(<0.6 KPa)	58 km上空の成層圏
高圧	マリアナ海溝チャレンジャー海淵の海底(110 MPa)	マリアナ海溝チャレンジャー海淵の海底(110 MPa)
酸性	カリフォルニア州地下鉱山廃水(pH -3.6)	カリフォルニア州地下鉱山廃水(pH 0)
アルカリ性	北ヨルダンマカリン天然セメント地下水(pH 12.9)	北ヨルダンマカリン天然セメント地下水(pH 12.7)
高塩濃度	塩湖や岩塩	塩湖や岩塩

次に、これらの液体の水が利用可能な極限環境の物理・化学条件限界に対する生物の生育限界と生存限界の広がりついて考える(図 1)[36]。生命存在可能条件とは、狭義では生物が現存バイオマスを増大させる(growth)もしくは維持(maintenance)できる条件であり、その限界条件が生育限界である。一方、広義の生命存在可能条件には、生育限界だけでなく、生物の現存バイオマスや個体(細胞)が一定時間に完全に死滅しない条件、生存限界までが含まれている場合が多い。

現在までに知られる生物の最高生育温度は、インド洋の深海底熱水活動域の高温熱水中(365 ˚C)で生成された鉱物から分離されたアーキア *Methanopyrus kandleri* 116 株の高水圧下での最高増殖温度 122 ˚C であり、また本菌は 10^8 cells/ml の細胞密度を有する培地中では、130 ˚C で 3 時間処理しても完全死滅することはない [38]。ただし、現場環境の 365 ˚C の熱水に増殖可能な微生物が検出されているので [38]、温度については温度・圧力以外の自然環境の条件を再現して評価する必要がある [36]。液体の水がほとんど存在しない乾燥条件では、高温での生存可能性はより増大すると考えられている。食品衛生学の分野では、300 ˚C、30 分の乾熱滅菌ではグラム陽性バクテリアの乾燥胞子を完全に死滅させることができない現象がよく知られており、乾眠状態の緩歩動物門のクマムシの一種は、151 ˚C で 35 分の乾熱処理後も死滅しない [30]。しかし残念ながら、優れた高温耐性を示す超好熱菌の乾燥菌体が、どれぐらい高温・乾燥状態での生存能力を有するのかについてはほとんど全く研究例がない。

反対に生物の最低生育温度は、実際の増殖実験で測定された記録としてはバクテリア *Psychromonas ingrahamii* の最低増殖温度-12 ˚C[6]、増殖速度定数と温度の理論的予想からバクテリア *Shewanella gelidimarina* の推定最低増殖温度-27 ˚C[5]、が知られている。また微生物の呼吸活性は、-33 ˚C でも検出されている [1]。低温での生存限界については、一般に微生物に限らず、細胞は冷凍状態にあると極めて長期間生存する。冷凍状態にある細胞の生存を決定づける因子として、構成タンパク質中のアミノ酸のラセミ化と構成 DNA の脱プリン化が指摘されている [20]。これらの化学反応は水分活性の低下に従い、あるいは温度の低下に従いその反応は抑制されるので、低温側の生存限界温度は水の有無に関わらず可能な限り低温であれば良い。

生物の最高生育圧力は、マリアナ海溝から分離された *Colwellia* sp. MT41 株というバクテリアの有する 130 MPa と言う記録がある [42]。高圧下での生物の生存については、グラム陽性バクテリアの形成する胞子について良く研究されており、実測では 120 ˚C、1.4 GPa の水溶液中で数分間処理しても、完全に死滅しない例が知られている [18]。この実測値から予想される水溶液中の理論限界生存圧力は 120 ˚C で 2 GPa であり、これは地球では 150km 以上の深海や 50km 以上の深部の地下水に相当する圧力であり、現実そのような水圏は存在しない。また胞子ではなく微生物栄養細胞でも、700 MPa では生存できることが知られている [17]。さらに水溶液中ではなく乾燥状態の生物の圧力に対する生存能力はより高く、クマムシの一種であるヨコズナクマムシは、乾眠状態では 7.5 GPa の圧力下で 13 時間処理しても死滅せず [24]、よりサイズの小さいコケ類の胞子はそれ以上の高圧耐性を示すらしい。おそらく微生物の乾燥菌体や乾燥胞子の高圧耐性は、さらに桁違いに高いことが予想されるが、残念ながら研究例は報告されていない。低圧条件については、低温と同じように利用し得る液体の水の存在量が生育の律速になり、逆に液体の水が低圧によって蒸気となることによって、いわゆる乾燥状態に近づいていくため長期生存には有利に働くことが考えられる。実際地上から 58 km 上空の成層圏から生きた微生物が採取されており [12]、微生物細胞や微生物および植物の胞子の生存は当然として、エアロゾル中での生育の可能性も十分考えられる。

生物の生育 pH 限界については、酸性側では pH 0 で生育できるアーキアが知られている [8, 34]。また pH 0 近くの条件で生育でき、pH0 で生存可能な真核生物も見つかっている [7, 31]。アルカリ性側では、南アフリカ金鉱の地下水のコンクリート貯水槽(pH 10.5)から分離されたグラム陽性バクテリア *Alkaliphilus transvaalensis* が pH 12.4 まで生育することができ、これが分離菌株による生育 pH アルカリ性限界である [37]。一方、既に紹介した北ヨルダンのマカリンに分布する高温変成作用を受けたビチューメン質泥灰岩・石灰岩地帯の pH 12.7 を示す地下水には、最大 3.3 x 10^5 cells/ml の微生物細胞が観察されている [27]。

この世界最高 pH を示す地下水に有機酸を添加し現場培養したところ、微生物のバイオマスの増加が観察されている[27]。その時の地下水の pH は 12.5 であり、微生物群集の優占種は *Pseudomonas* 属バクテリアであったと報告されている[27]。しかしこの結果を生物の生育 pH アルカリ性限界と考えるにはまだ証拠が不十分である。また *Alkaliphilus transvaalensis* などの好アルカリバクテリアの生存に及ぼす pH の影響は調べられた研究例はないが、生育限界を超える pH で生存可能であることは容易に想像でき、かつ *Alkaliphilus transvaalensis* は胞子を形成することができる。グラム陽性バクテリアの形成する胞子の対化学因子耐性は、熱や圧力といった対物理因子耐性を遙かに上回ることが知られているので、おそらく *Alkaliphilus transvaalensis* の胞子の pH 耐性は pH14 であってもすくなくとも数日から数ヶ月は容易に生存できると推測される。

生物の生育や生存における塩濃度の限界条件としては、栄養としての無機・有機物塩を除去しないという前提に立てば、多くの陸水性生物や微生物は塩濃度ほぼ 0 で生育可能であり、飽和塩濃度(NaCl で換算して約 30 % w/v)であっても、多くの高度好塩アーキアといくつかの高度好塩バクテリアは生育可能である。また生命の生存に関しては、高塩分水から生じる塩の結晶(岩塩)は、自然環境に存在する格好の微生物生存環境となる[40]。生きた微生物として回収された最も古い微生物の報告は、2.5 億年前の *Bacillus* 属バクテリア[40]、古代 DNA としての報告は、4.2 億年前の高度好塩アーキアの遺伝子[25]があり、いずれも保存の良い地下岩塩から回収されている。ただし、それらの報告は事実として広く受けいれられているわけではない。

以上、各々の主要な物理・化学条件における生命の生育限界と生存限界について概説した。これら地球生命の生育や生存における単独の物理・化学環境条件の限界は、あくまで現時点での到達点であり、今後も研究の進展によって拡張されてゆくことは間違いない。これらの限界値は、少なくとも各物理・化学条件がこの範囲内にあれば、地球生命が生育あるいは存在し得るという最小の範囲を示すものである。この生命存在条件範囲を地球において確認された極限環境と比較した場合(図 1)、温度を除くほとんどすべての条件は、すでに生育可能な範囲にあることがわかるであろう。このことからも、高温環境を除けば地球において生命が存在できない環境がほとんどないということも理解できる。ただし、これらの考察はあくまで、単独の条件に限定した場合であり、様々な条件が複合した場合、それぞれの限界値は相乗的に影響を受ける組み合わせもある。実際の複合極限環境条件では、単独の条件よりも限界値がかなり低くなることが知られている[21]。

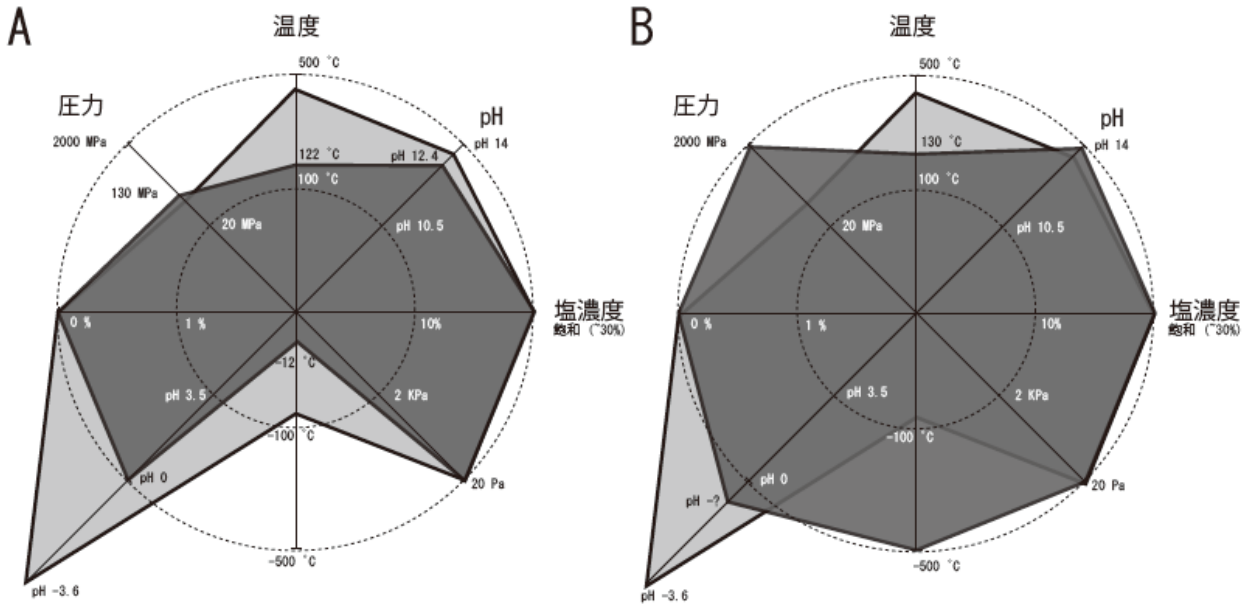

図 1　地球における液体の水が利用可能な極限環境の物理・化学条件限界と生物の生育限界と生存限界。(A) 液体の水が利用可能な極限環境の物理・化学条件限界(薄い灰色の領域)に対する実験室内で再現可能な微生物の生育(増殖)限界条件(濃い灰色の領域)の広がり。(B) 液体の水が利用可能な極限環境の物理・化学条件限界(薄い灰色の領域)に対する実験室内で再現可能な水中における微生物の生存限界条件(濃い灰色の領域)の広がり。

極限環境生物ののエネルギー論的生命存在条件 (habitability)

ここまで紹介した各主要な物理・化学条件における地球における生物の生育限界と生存限界は、極めて限定された項目条件とは言え、明確な生命存在条件領域を表すものと言える。とはいえ、あくまで、「現時点までに知られる地球生命の最も小さく見積もられた生命存在条件の一端」にすぎない。しかし地球における生命活動の限界や地球外生命の生命活動を見極めるには、「地球生命の生命存在条件の一端」だけでなく、宇宙共通原理として科学的に検証可能な確固たる拠所となる概念が必要である。そのなかで考え出された概念が、habitability(生命存在条件)である。

そしてこの生命存在条件という概念を初めて公式化したのは Hoehler[10]である。彼の提案する「エネルギー論としての生命存在条件」という概念は、極めて複雑な系としての生命活動を、エネルギーポテンシャル(電圧)とエネルギー量(電力)の二つの要素だけで制約するものであった(図 2)。Hoehler[10]は、エネルギー論としての生命存在条件は、以下の 4 つのしきい値で縁取られるエネルギー領域であると定義した。

(1)生命活動の原動力になる「系の複雑さ」を維持する最小のエネルギーポテンシャル(biological energy quantum: BEQ)。つまりこれ以下のエネルギーポテンシャルでは生命活動のために利用できないという限界値。

(2)「系の複雑さ」が維持され得る最大のエネルギーポテンシャル。つまりこれ以上のエネルギーポテンシャルでは系が制御不能になる限界値。

(3)「系の複雑さ」を維持する最小の仕事量(maintenance energy: ME)。生命活動の維持に必要な最小のエネルギー量。

(4)「系の複雑さ」が受け入れることのできる最大のエネルギー量。つまり生命活動を暴走させない最小のエネルギー量。

この 4 つのしきい値のうち、エネルギーポテンシャルとエネルギー量に関する上方の境界は、生命活動の溶媒である水やその他の可能性のある溶媒の存在状態に大きく依存し、また、その生命活動を支える系自体の構成や構造が明確でないとその限界を正確に見極めることが難しいが、地球の生命について言えば、上記の最高生育温度や放射線生存耐性限界や紫外線生存耐性限界のような「生命活動を支える系」の安定性の限界と捉える事ができる。

むしろ生命活動の維持に必要な最小のエネルギーポテンシャルやエネルギー量の方が、地球における生命存在領域を考える上でも、地球外生命探査を考える上でも重要である。特に生命活動の維持に必要なエネルギーが欠乏していると考えられてきた大陸地殻の岩石[27, 35]や深部海底下堆積物中[26]に予想外の微生物バイオマスが存在するという発見が、そのような環境においても生命存在条件が満たされている、すなわち BEQ や ME が確保されている、という事実を提示することとなった。地球の極めて生命が存在し難いと考えられてきた環境において生命存在条件が満たされているならば、地球外惑星や衛星においても生命存在条件は満たされている可能性は増大する。それが、地球における地球生命の生命存在条件の限界、つまり生命圏の境界、を探査する目的の一つである。

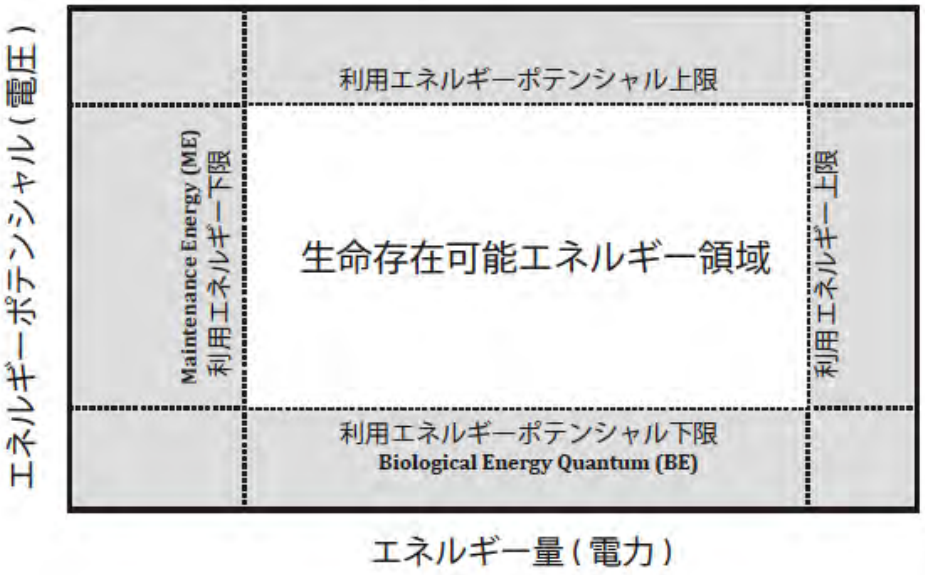

図 2　Hoehler[10]提案するエネルギー論としての生命存在可能条件の概念図(原図を改変)。Hoehler[10]は、エネルギー論的生命存在可能領域は 4 つのしきい値で縁取られるエネルギー領域であると結論づけた。

では、地球における生命のエネルギー論的存在条件、特に BEQ や ME、はどこまで明らかにされたのであろうか？BEQ、つまり生命活動を維持するのに必要な最小限のエネルギーポテンシャル(ギブス自由エネルギー変化)、については、まず生命活動の共通エネルギー貯蔵物質であるアデノシン三リン酸(ATP)が生物膜において生成される際に必要なエネルギーポテンシャルから見積もられた[33]。アデノシン二リン酸(ADP)から ATP をプロトン勾配駆動 ATP 合成酵素で合成する際、必要な最小限のギブス自由エネルギー変化は約-60 KJ/molATP であり、1 分子の ATP 当たり 3 つのプロトン(電子)が必要とされるため、1 電子あたりのギブス自由エネルギー変化は -20 KJ/mol と予想される。実際の微生物培養実験によって、微生物の増殖を支える最小でのエネルギーポテンシャルを見積もると、確かに-20 KJ/mol 程度であることが明らかになった[33]。この結果はつまり、「-20 KJ/mol 程度(電位で言えば-200 mV 程度)以上のギブス自由エネルギー変化を生み出せないような熱力学的非平衡環境条件では生命が存在できない」ということを意味する。しかし現実の地球環境や実験室内培養環境では、-20 KJ/mol 以下のエネルギーポテンシャルしか生み出せないような条件下でも、微生物は増殖あるいはバイオマスを維持することができることが明らかになった[14]。そのような微生物の生育は共栄養共生というメカニズムに依存しており、共栄養共生微生物培養実験系での結果から BEQ を見積もった場合、最小値は-5 KJ/mol 程度という値が得られた[14]。さらに Hoehler[11]は、自然環境におけるエネルギーポテンシャルの見積りと微生物群集の活性に基づき、およそ-10 KJ/mol 程度が BEQ となることを指摘している。つまり微生物実験や自然環境中の微生物群集の活性からは、少なくとも-5ー-10 KJ/mol 程度のエネルギーポテンシャルが確保されるエネルギー環境であれば、生命活動の維持が可能であることが分かった。

BEQ はあくまでエネルギーポテンシャルのしきい値であり、実際に必要なエネルギー量ではない。生命活動を維持する最小のエネルギー量であると定義される ME の方が、現実の環境ではより支配的であろう。この ME については、速度論的[29]及び熱力学的[19]なアプローチにより見積もりが報告されている。Price and Sower[29]は、微生物群集の一定バイオマス当たり(gC)の炭素取り込み速度と環境温度の関係から、地球の様々な生命活動の維持が困難と考えられる極限環境における微生物群集の存在状態が、growth(増殖)、maintenance(維持)、survival(生存)に分けられることを見出した(Hoehler の定義する ME はこの場合 survival 状態に相当する)。そして生命活動を維持するための条件は、タンパク質中のアスパラギン酸のラセミ化の反応速度上回る程度の代謝速度が確保される必要があるという見積もりを行った。その結果は、生命活動を維持するための代謝速度は増殖に必要な代謝速度の 10^{-3}ー10^{-6} 程度にすぎないことを示した(図 3)。その代謝速度とは、例えば-40°C の氷に閉じ込められた微生物が生存するためには、1 億年間で 1 回程度の倍加時間を確保すれば生存可能となる程度である(図 3)[34]。個人的には、この見積もりはあまりに不確定要素の大きな仮定が導入されており、一億年のターンオーバー速度という具体的な数値はあまり信憑性がないと考える。しかし重要なのは、増殖と生存において必要な代謝速度が極めて差が大きいということであり、低温環境であれば生命活動の維持は極めて容易であるということを明確に示した点であろう。

一方 McCollom and Amend[19]は、細胞を構成する有機物をすべて合成(複製)するのに必要な最小限のエネルギー量を、細胞を構成する有機物の組成と存在量および現在利用可能な有機物合成化学反応の熱力学的データベースから近似計算によって見積もった。彼らの計算によると、1g の細胞を完全に複製する代謝に必要なエネルギー量は、好気条件下では 18.4 KJ、嫌気条件下では 1.4 KJ であると見積もられた。この研究の極めて重要な点は、生命活動の維持に必要な最小のエネルギー量を、検出に絶対的な限界のある観測・分析・定量に依存するパラメーター(例えば、代謝活性速度や細胞密度や化学物質の濃度)を使わずに、化学反応に固有の熱力学的なパラメーターを使うことによって、初めて定量的な ME の総量を見積ることができた点である。生命活動の維持に必要な最小のエネルギー総量の具体的な値が示されたことによって、生命の最小単位である細胞の量とそのエネルギー量が供給されるべき時間単位が仮定されれば、その環境における ME を算出することができるようになった。

これら生物のバイオマスの維持に必要な細胞の代謝回転速度と ME の見積もりから、地球の生物(微生物細胞)の生命存在可能条件を具体的に算出してみる。例として著者が分離した好熱性メタン菌 *Methanotorris formicicum*[39]を考える。本菌は直径 1 μm の球菌で、最適条件では 70 ˚C で 30 分の倍加時間を有する水素資化メタン菌である。本菌 1 細胞あたりの平均質量は 4.7×10^{-12} g であり、このメタン菌の 1 細胞が、例えば 25 ˚C で自己維持するために必要なエネルギー量が、McCollom and Amend[19]の見積もりである 1.4 KJ/gcells の値から 6.6×10^{-9} J と算出できる。次に Price and Sower[29]の 25˚C におけるアスパラギン酸のラセミ化速度に匹敵する代謝速度は 3×10^{-6} gC/gC•h と仮定できる。つまり 3×10^{6} 時間で 6.6×10^{-9} J のエネルギーを得られれば、このメタン菌 1 細胞は 25 ˚C で生命活動を維持できるという計算が成り立つ。このメタン菌は水素と二酸化炭素からエネルギーを獲得し、例えば標準状態で 4 mol の水素と 1 mol の二酸化炭素から得られるエネルギーは 1.3×10^{5} J である。よってこのメタン菌 1 細胞が 25˚C で生命を維持するためには、1 細胞空間に 340 年間に水素が 2×10^{-13} mol、二酸化炭素が 0.5×10^{-13} mol 程度供給される必要があると言うことである。もちろんこの場合、流体が動くことによっても、その場での化学反応で生成されてもよい。そしてその

水素供給量は、地球表層の(海洋や地殻上部を含む)水圏環境において、主要な非生物学的水素生成メカニズム、例えば蛇紋岩化反応[2]、水の放射線分解[4]、岩石破壊や摩擦に伴う機械化学反応[9]、などによって容易に達成されると考えられる。もちろん水素だけが生命活動のエネルギー源ではない。しかし、宇宙環境における最も普遍的なエネルギー源としての水素供給量から考えた具体的な生命存在可能条件の見積もりは、地球においてエネルギー論的に生命が生存（少なくとも生命活動を維持）できない環境を見つける事が難しいことを明確に示すものである。

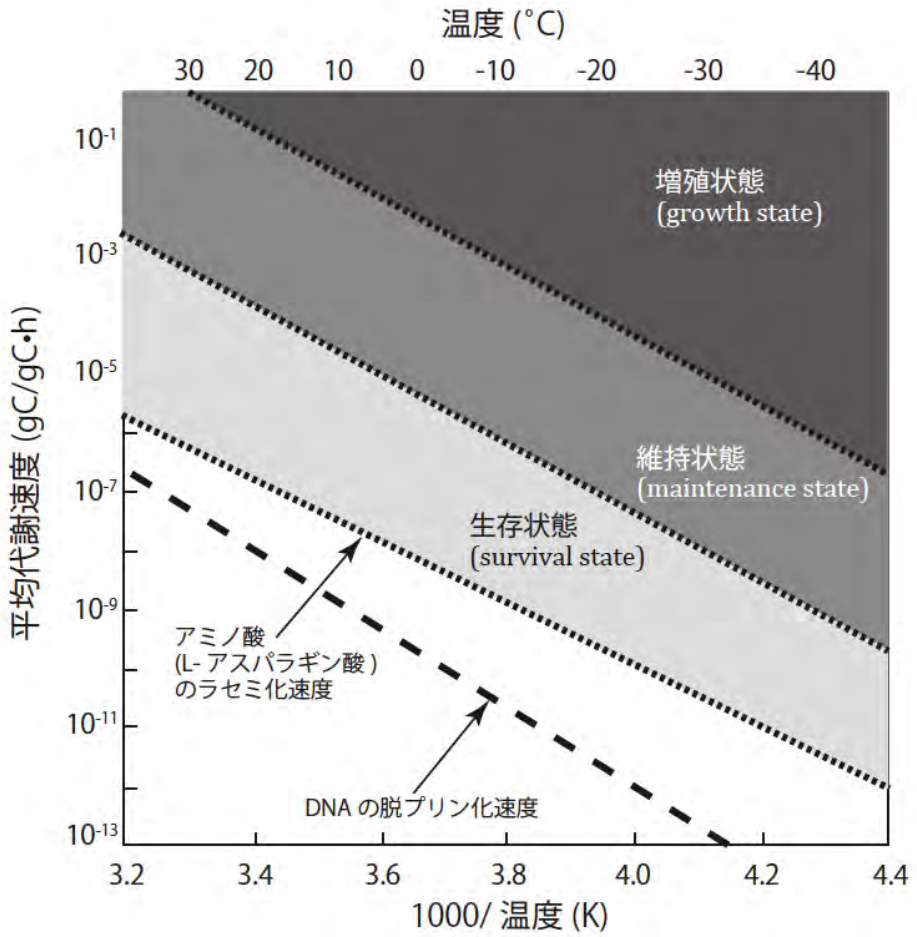

図 3　Price and Sower[29]による温度と微生物の増殖(growth)、維持(maintenance)、生存(survival)に必要な代謝速度(世代交代速度)の関係についての模式図(原図を改変)。生存(survival)に必要な代謝速度は、少なくとも L-アスパラギン酸の自然ラセミ化速度を上回る必要がある。

McCollom and Amend[19]によって見積もられた ME は、実際の微生物の増殖実験から見積もられる ME に比べて遙かに少ないエネルギー量であることが知られている。例えば、上記の好熱性メタン菌 *Methanotorris formicicum* の 1 細胞が自己維持するために必要なエネルギー量は、McCollom and Amend[19] の ME を用いた場合、6.6 x 10^{-9} J であった。一方、Takai et al.[39]の培養実験において、1 細胞が倍加するのに必要な水素消費量から見積もられるエネルギー量は、およそ 4.9 x 10^{-3} J である。もちろん極めてエネルギー論的に有利な培養条件下で微生物はエネルギー代謝によって得られたエネルギーをすべて増殖に用いるわけでなく、エネルギー消費が非効率的であることは予想がつく。さらに、そもそも *Methanotorris formicicum* のような好熱性メタン菌は、エネルギー源である水素が極めて豊富な深海熱水環境に生息する微生物であり、おそらく生育のためのエネルギー効率が最も悪い微生物のグループであると考えられる。にもかかわらず、熱力学的計算によって見積もられた ME と実際の実験において観察される生育に必要なエネルギー量の格差は極めて大きい。今後、生物の生育や生存にとって極めて厳しい極限環境におけるエネルギー論から見た生命存在条件の研究が進むことによって、その格差をどこまで縮小することができるかを見極める必要がある。いずれにせよ、エネルギー論に基づいた生命存在可能性の理解が、地球における生命や生命圏の限界や地球外生命の存在の探査において、極めて重要な概念かつ研究戦略となることは間違いない。

今後の展望

本論では、地球生命の限界や生命圏の限界を明らかにする研究の到達点や問題点について紹介してきた。地球生命の限界や生命圏の限界を明らかにする研究は、将来の地球外惑星や衛星における生命探査に不可欠の科学理論や研究戦略、分析技術や方法論の根幹を構築するだけでなく、「生命とは何か」を理解する基盤を成すものである。

しかし地球生命の限界や生命圏の限界を明らかにする研究にはまだまだ克服すべき問題が存在する。例えば我々は、この地球において未だ生命存在環境と生命非存在環境の境界やその条件について、具体的な証拠を明示することができていない。また、海底下地殻内環境には地球における最大の潜在バイオマスが存在するという仮説の提示[41]から 10 年以上経過して、その見積もりが大きく下方修正され[15]、未だその正確なバイオマスを定量するに至っていない。同様に、地殻内環境には地球表層環境とは系統的に大きく異なる多様な微生物が存在していることを示したにもかかわらず[13]、その優占微生物群の実際の機能を現場環境において捉えることができず、それどころか機能の多くは未解明のままである。

「生命とは何か」を知るためには、我々が唯一知っている「地球生命」だけでなく、おそらく宇宙においても幾多に存在すると考えられる地球外生命のあり方との比較を通じて、宇宙共通原理としての「生命論」を構築する必要があるというアストロバイオロジーの大きな理念は極めて説得力に富み、その理念や科学目標は求心力のある魅力的な研究テーマや研究プロジェクトを生み出す原動力である。しかし一方で、地球における生命を十分に理解することなく、地球外生命を探査・識別・検出することは一種の賭けでしかなく、かつ大きな理念を達成することは不可能であろう。著者は、地球における生命圏と非生命圏の境界に生存する極限環境生物に対する本質的な理解を追求することこそ、その大きな理念や科学目標に到達するための最も重要な第一歩であると信じている。

引用文献

1) Bakermans, C., Skidmore, M. 2011. Microbial respiration in ice at subzero temperatures (-4 degrees C to-33 degrees C). Environ. Microbiol. Rep. 3: 774-782.
2) Berndt, M. E., Allen, D. E., Seyfried, W. E. 1996. Reduction of CO_2 during serpentinization of olivine at 300 degrees C and 500 bar. Geology 24: 351-354.
3) Bischoff, J. L. Rosenbauer, R. J. 1985. An empirical equation of state for hydrothermal seawater (3.2 percent NaCl). Am. J. Sci. 285:725-763.
4) Blair, C. C., D'Hondt, S., Spivack, A. J., Kingsley, R. H. 2007. Radiolytic hydrogen and microbial respiration in subsurface sediments. Astrobiology 7: 951-970.
5) Bowman, J. P. 2002. Psychrophilic bacteria: isolation and chracterization. pp. 2639-2646. Bitton, G. (ed), In: Encyclopedia of Environmental Microbiology, John Wiley & Sons.
6) Breezee, J., Cady, N., Staley, J. T. 2004. Subfreezing growth of the sea ice bacterium "*Psychromonas ingrahamii*". Microbial Ecol. 47: 300-304.
7) Doemel, W. N., Brock, T. D. 1971. The physiological ecology of *Cyanidinium caldarium*. J. Gen. Microbiol. 67, 17-32.
8) Edwards, K. J., Bond, P. L., Gihring, T. M., Banfield, J. F. 2000. An archaeal iron-oxidizing extreme acidophile important in acid mine drainage. Science 287:1796-1799.
9) Hirose, T., Kawagucci, S., Suzuki, S. 2011. Mechanoradical H-2 generation during simulated faulting: implications for an earthquake-driven subsurface biosphere. Geophys. Res. Lett. 38: L17303.
10) Hoehler, T. M. 2004. An energy balance concept for habitability. Astrobiology7: 824-838.
11) Hoehler, T. M. 2007. Biological energy requirements as quantitative boundary conditions for life in the subsurface. Geobiology 2: 205-215.
12) Imshenetsky, A. A., Lysenko, S. V., Kazakov, G. A. and Ramkova, N. V. 1976. On micro-organisms of the stratosphere. Life Sci. Space Res. 14: 359-362.
13) Inagaki, F., Nunoura, T., Nakagawa, S., Teske, A., Lever, M., Lauer, A., Suzuki, M., Takai, K., Delwiche, M., Colwell, F. S., Nealson, K. H., Horikoshi, K., D'Hondt, S., Jørgensen, B. B. 2006. Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep marine sediments, on the Pacific Ocean Margin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 2815-2820.
14) Jackson, B. E., McInerney, M. J. 2002. Anaerobic microbial metabolism can proceed close to thermodynamic limits. Nature 415: 454-456.
15) Kallmeyer, J., Pockalny, R., Adhikari, R. R., Smith, D. C., D'Hondt, S. 2012. Global distribution of microbial abundance and biomass in subseafloor sediment. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109: 16213-16216.
16) Kato, C., Li, L., Tamaoka, J., Horikoshi, K. 1997. Molecular analyses of the sediment of the 11,000-m deep Mariana Trench. Extremophiles 1: 117-123.
17) Klotz, B., Pyle, D. L., Mackey, B. M. 2007. New mathematical modeling approach for predicting microbial inactivation by high hydrostatic pressure. Appl. Environ. Microbiol. 73: 2468-2478.
18) Margosch, D., Ehrmann, M. A., Buckow, R., Heinz, V., Vogel, R. F., Gänzle, M. G. 2006. High-pressure-mediated survival of *Clostridium botulinum* and *Bacillus amyloliquefaciens* endospores at high temperature. Appl. Environ. Microbiol. 72: 3476-3481.
19) McCollom, T. M., Amend, J. P. 2005. A thermodynamic assessment of energy requirements for biomass synthesis by chemolithoautotrophic

micro-organisms in oxic and anoxic environments. Geobiology 3: 135-144.

20) McKay, C. P. 2001. The deep biosphere: lessons for planetary exploration. pp. 315-327. In: Subsurface Microbiology and Biogeochemistry, Fredrickson, J. K., Fletcher, M. (eds), Wiley-Liss.

21) Mesbah, N. M., Wiegel, J. 2009. *Natronovirga wadinatrunensis* gen. nov. sp. nov. and *Natranaerobius trueperi* sp. nov., two halophilic alkalithermophilic microorganisms from soda lakes of the Wadi An Natrun, Egypt. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59: 2042–2048..

22) Nordstrom, D. K., Alpers, C. N. 1999. Negative pH, efflorescent mineralogy, and consequences for environmental restoration at the Iron Mountain Superfund site, California. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 3455-3462.

23) Nordstrom, D. K., Alpers, C. N., Ptacek, C. J., Blowes, D. W. 2000. Negative pH and extremely acidic mine waters from Iron Mountain, California. Environ. Sci. Tech. 34: 254-258.

24) Ono, F., Saigusa, M., Uozumi, T., Matsushima, Y., Ikeda, H., Saini, N. L., Yamashita, M. 2008. Effect of high hydrostatic pressure on to life of the tiny animal tardigrade. J. Phys. Chem. Solid 69: 2297-2300.

25) Park, J. S., Vreeland, R. H., Cho, B. C., Lowenstein, T. K., Timofeeff, M. N., Rosenzweig, W. D. 2009. Haloarchaeal diversity in 23, 121 and 419 MYA salts. Geobiology 7: 515-523.

26) Parkes, R. J., Cragg, B. A., Bale, S. J., Getliff, J. M., Goodman, K., Rochelle, P. A., Fry, J. C., Weightman, A. J., Harvey, S. M. 1994. Deep bacterial biosphere in Pacific Ocean sediments. Nature 371: 410–413.

27) Pedersen, K. 1997. Microbial life in deep granitic rock. FEMS Microbiol. Rev. 20: 399–414.

28) Pedersen, K., Nilsson, E., Arlinger, J., Hallbeck, L., O'Neil, A. 2004. Distribution, diversity and activity of microorganisms in the hyper-alkaline spring waters of Maqarin in Jordan. Extremophiles 8: 151-164.

29) Price, B. P., Sowers, T. 2004. Temperature dependence of metabolic rates for microbial growth, maintenance, and survival. Proc. Natl. Acad. Sci. USA,101: 4631-4636.

30) Rahm, P. G. 1921. Biologische und physiologische Beiträge zur Kenntnis de Moosfauna *Z. allgem.* Physiol. 20: 1-35.

31) Rothschild, L. J., Mancinelli, R. L. 2001. Life in extreme environments. Nature 409: 1092-1101.

32) Salisbury, M.H. 2002. ODP Leg 195 Shipboard Scientific Party Site 1200. Proc. Ocean Drill. Prog. Init. Rep. vol. 195: (http://www-odp.tamu.edu/publications/195_IR/195TOC.HTM).

33) Schink, B. 1997. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61: 262-280.

34) Schleper, C., Pühler, G., Kühlmorgen, B. and Zillig, W. 1995. Life at extremely low pH. Nature 375: 741-742.

35) Stevens, T. O., McKinley, J. P., 1995. Lithoautotrophic microbial ecosystems in deep basalt aquifers. Science 270: 450–454.

36) Takai, K. 2011. Part 8: Traces of life and biosignatures, Chapter 8.4: Limits of life and biosphere: lesson from detection of microorganisms in deep-sea and deep subsurface in the Earth. pp. 469-486. In: Astrobiology, Gargaud, M., Lopez-Garcia, P., Martin, H. (eds), Cambridge Univeristy Press.

37) Takai, K., Moser, D. P., Onstott, T. C., Spoelstra, N., Pfiffner, S. M., Dohnalkova, A., Fredrickson, J. K. 2001. *Alkaliphilus transvaalensis* gen. nov., sp. nov., an extremely alkaliphilic bacterium isolated from a deep South African gold mine. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 1245-1256.

38) Takai, K., Nakamura, K., Toki, T., Tsunogai, T., Miyazaki, M., Miyazaki, J., Hirayama, H., Nakagawa, S., Nunoura, T., Horikoshi, K. 2008. Cell proliferation at 122 ˚C and isotopically heavy CH_4 production by a hyperthermophilic methanogen under high pressures cultivation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105, 10949-10954.

39) Takai, K., Nealson, K. H., Horikoshi, K. 2004. *Methanotorris formicicus* sp. nov., a novel extremely thermophilic, methane-producing archaeon isolated from a black smoker chimney in the Central Indian Ridge. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 1095-1100.

40) Vreeland, R. H., Rosenzweig, W. D., Powers, D. W. 2000. Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. Nature 407: 897-900.

41) Whitman, W. B., Coleman, D. C., Wiebe, W. J. 1998. Prokaryotes: the unseen majority. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 6578-6583.

42) Yayanos, A. A. 1986. Evolutional and ecological implications of the properties of deep-sea barophilic bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 9542-9546.

極限環境生物学会第 13 回年会報告

第 13 回年会は、12 月 1-2 日（土・日）に日本大学文理学部（世田谷区桜上水）、3 号館 5 階にて開催されました。当日は、多くの会員・非会員の皆様にご参集いただき、口頭発表 23 件、ポスター発表 69 件の一般発表の他、気鋭の日大の 3 名の先生方による特別セッション（日大セッション）を年会オーガナイザーの為我井先生（日大）に企画していただき、更に、東京薬科大の渡邉先生による特別講演、学会奨励賞受賞講演 2 件と大変盛りだくさんな会となりました。参加者合計は **273** 名（内訳を以下の表に示す）となり、前回の長崎年会参加者 204 名を大きく上回る参加者人数となりました。年会のお世話をいただきました、日本大学・為我井先生（学術幹事）には、年会開催に向け精力的に奔走していただきました。ここで、為我井先生に感謝申し上げるとともに、当日ご参加いただいた皆様方に事務局一同心より感謝申し上げます。

	事前申し込み人数	当日申し込み人数	合計
一般	83 （会員 76、非会員 7）	36 （会員 9、非会員 27）	119 （会員 85、非会員 34）
学生	131 （会員 23、非会員 108）	23 （会員 0、非会員 23）	154 （会員 23、非会員 131）
総計	214 （会員 99、非会員 115）	59 （会員 9、非会員 50）	**273** （会員 108、非会員 165）

今回も、企業技術コーナーには以下の 6 社にご参加いただきました。
和光純薬工業株式会社
日本電子株式会社
家田貿易株式会社+筑波家田株式会社
ライカ マイクロシステムズ株式会社
株式会社トミー精工
日鉄住金環境株式会社

学会事務局より、年会へのご協力に関して心より感謝申し上げます。

【特別講演】
東京薬科大学の渡邉一哉先生に「共生の極み」と題して、ご講演をいただきました。微生物電池に関するご自身の研究から、微生物間の相互作用、共生といった現象にご興味をもたれ、微生物の能力を利用した電気共生など次世代エナジーへと向かう社会の要請に取り組む最先端のご研究をご紹介いただきました。

為我井先生、藤原先生、渡邉先生

【日大セッション】
為我井先生の企画により、以下の 3 名の気鋭の先生方によるご講演をいただきました。

澤田博司先生（日本大学文理学部総合文化研究室）
「カイコの休眠と休眠阻害の分子機構」

橋本伸哉先生（日本大学文理学部化学科）
「微生物によるハロカーボンの生成」

菅原正雄先生（日本大学文理学部化学科・2012 年度日本分析化学会学会賞）
「微小酵素センサーによる哺乳類大脳海馬中のグルタミン酸の計測」

【奨励賞受賞講演】
2012 年度の学会奨励賞は次の 2 名に決定し、受賞講演をいただきました。
・井上謙吾　先生（宮崎大学・IR 推進機構）「微生物の電子伝達による環境汚染物質分解と発電」
・郷田秀一郎先生（長崎大院・工学研究科）「超好熱菌由来グルタミン酸脱水素酵素の熱活性化機構の解明」

井上先生は、大学院生時代当学会で何回もご発表されており、その後米国留学を経て大きく成長され、当学会に帰ってきていただいた先生です。また郷田先生は、2002 年度に行われた徳島年会で開催をサポートしていただいて以来、当学会でご活躍いただいております。今回のご受賞大変におめでとうございました。

【優秀ポスター賞】
優秀ポスター賞は、審査員による厳正な審査の結果、以下の 6 名に授賞されました。
P-20 櫛田卓志（東洋大学大学院・生命科学研究科）*Thermococcus kodakarensis* の *polB* 遺伝子破壊株の表現型解析
P-32 濱島裕輝（立教大学大学院･生命理学）深海由来絶対好圧菌由来のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の耐圧性は 1 アミノ酸に起因する
P-42 冨田宏矢（京都大学大学院 工学研究科）アーキアの補酵素 A 生合成に関する酵素学的解析および制御機構の解明
P-46 小野寺威文（東京薬科大院・生命科学）*Deinococcus* と *Thermus* に共通する新規 DNA 鎖間架橋修復遺伝子の遺伝学的解析
P-58 松澤淳（東京大学・生物生産工学研究センター）Carbazole 1,9a-dioxygenase における酸化酵素-ferredoxin 間の結合解離メカニズムの解明
P-64 若井暁（広島大学大学院・生物圏科学研究科）高度好塩性菌 *Haloarcula japonica* のピロリン酸加水分解の熱力学的視点から見た塩適応

【名誉会員制度の創設】
年次総会において、当学会の名誉会員制度*が新たに創設されることが承認されました。今後学会事務局を中心に選考作業が進められます。
*会則第 4 条 3 項：名誉会員は、当学会の発展や分野に功労のあった者で、幹事会による推薦、評議員会による承認を経て、会長の指名により決定され、当学会の催すシンポジウム・年会等に招待される。

【2013 年度より学会事務局が変更となります】
これまでの井上幹事長（東洋大）・加藤庶務幹事（JAMSTEC）の学会事務局体制が、2013 年度より若返ります。会長指名により、中村聡幹事長（東工大）・伊藤政博庶務幹事（東洋大）を中心に新学会事務局が編成され、事務局を東工大すずかけ台キャンパスに移行することが，総会にて報告されました。
→新事務局の連絡先：〒226-8501　横浜市緑区長津田町 4259-J2-13
東京工業大学　大学院生命理工学研究科
生物プロセス専攻　中村聡研究室内
極限環境生物学会事務局　中村　聡　(幹事会幹事長)
FAX: 045-924-5837　E-mail: kyokugenjm10@extremophiles.jp

極限環境生物学会事務局

学会誌投稿規定

極限環境生物学会誌投稿規定

１．投稿者の資格
極限環境生物学会誌（ISSN 1348-5474） (Journal of Japanese Society for Extremophiles)（以下、本誌という）への投稿は極限環境生物学会（以下、本学会という）会員に限る。なお、連名による投稿の場合には、少なくとも著者の一人が本学会会員でなければならない。ただし、日本国以外からの投稿並びに本学会が寄稿を依頼した場合は例外とする。

２．論文の種類
本誌への投稿論文は、極限環境生物関連分野の原著論文（通常論文、短論文）、総説、並びに諸報とし、いずれも未発表のものに限る。
（１）原著論文 (original papers)：極限環境生物に関する論文で以下の２つのいずれかに該当する論文。
１）通常論文 (regular papers)：極限環境生物に関する論文で、それ自体独立した、価値のある結論あるいは事実を含む論文。
２）短論文 (short communications)：極限環境生物に関する論文で、断片的な結果ではあるが新しい事実や価値のあるデータを含む短い論文。
（２）総説 (reviews)：極限環境生物のある特定の研究分野について、簡単な歴史的背景を含め、最近の進歩を要約し、可能であれば、将来の研究方向性をも指し示した論文。
（３）ミニレビュー (mini-reviews)：総説の内、比較的短く纏めたもの。
（４）諸報：巻頭言、研究最前線、研究のルーツを探る、学会関連記事等。

３．論文の書き方
論文の用語は日本語または英語とし､別途定める｢原稿執筆要領｣に従い簡潔に分かりやすく作成すること。総説は原稿３０頁以内、通常論文は原稿２０頁以内、ミニレビューは原稿１５頁以内、短論文は原稿１０頁以内とする。なお、諸報の頁数に関しては編集委員会で適宜判断する。

４．論文の受付
論文原稿は諸報を除き、原稿原本の他にコピー３部を付け、送付状とともに簡易郵便書留として下記宛に送付すること。なお、オンラインによる投稿も受け付ける。この場合、極限環境生物学会ホームページに掲載されている投稿要領に従うこと。

〒113-8657　東京都文京区弥生 1-1-1 東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻（東大院農生科応生工と省略可）極限環境生物学会誌編集委員長　石井正治 (電話：03-5841-8258, FAX：03-5841-5272) (e-mail: amishii@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp)

５．論文の審査
投稿された論文の内、原著論文、総説、ミニレビューの審査には、極限環境生物学会誌編集委員の内１名が責任編集委員として関与する。原著論文および総説の審査は、責任編集委員が適宜指名する複数の査読者によりなされる。掲載の可否に関する最終判定は、査読者からの査読結果報告に基づき責任編集委員が行う。その後、編集委員長が著者に審査結果を通知する。なお、内容・体裁に問題があると判断された原稿については、著者による修正を求める。修正を求められた原稿は、２ヶ月以内に責任編集委員に返送することとし、２ヶ月を過ぎて返送されなかった原稿は、著者が原稿を取り下げたものとして処理する。なお、投稿された論文は返却しない。

６．校正
校正は初稿のみ著者に送付する。到着日より３日以内に、原稿とともに指定された送付先に返送すること。なお、原著論文ならびに総説に関しては、著者校正時の文章・図表の追加や削除は一切認めない。

７．別刷り
別刷りは、pdf ファイルとして配布する。

８．著作権
本誌に掲載された論文の著作権は本学会に帰属する。

９．その他
極限環境生物学会誌投稿規定ならびに極限環境生物学会誌論文執筆要領で不明な部分に関しては、極限環境生物学会誌編集委員会において適宜対応する。なお、必要が認められる場合には、文書化を進めるものとする。

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（複数の場合は a, b, c・・で表記）、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行で印刷することが望ましい。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、ワープロで変換できない場合、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が望ましい。

（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

Kato, C. 2011. 5.2 High pressure and prokaryotes. In: “Extremophiles Handbook” pp. 657-668. (Eds. Horikoshi, K., Antranikian, G., Bull, A., Robb, F. and Stetter, K.), Springer-Verlag, Tokyo.

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

1. 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。
3. 名誉会員は、当学会の発展や分野に功労のあった者で、幹事会による推薦、評議員会による承認を経て、会長の指名により決定され、当学会の催すシンポジウム・年会等に招待される。
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は年額 2,000 円）

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

1. 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）

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。

1. 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。
2. 評議員の任期は２年とし重任を妨げないが、連続３期を限度とする。但し、会長が指名する評議員はこの限りではない。

（委員会）

第１１条　本会に学会誌編集委員会、研究奨励賞選考委員会、シンポジウム委員会を置く。各委員会委員の任期は 2 年とするが重任をさまたげない。

1. 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。
2. 研究奨励賞選考委員会（副会長が委員長を勤め、学術活動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。
3. シンポジウム委員会（会長指名の若干名

で構成し、委員長は互選する）は学術活動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。

（評議員会）

第１２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１３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１４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１５条　本会の事業年度は１月１日に始まり、同年 12 月 31 日に終る。

（付則）

第１６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１７条　本会則の変更は総会の議決を経て行う。

第１８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

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。

（評議員会）

第７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８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９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１０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１１条　本細則の変更は総会の議決による。

（付則）

第１２条　今期の本会事務局は、東京工業大学大学院生命理工学研究科　中村聡研究室（横浜市緑区長津田町）内とする。

第１３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

運営体制

極限環境生物学会運営体制（2013 年度）

会長	掘越　弘毅	独立行政法人 海洋研究開発機構
副会長	大島　泰郎	共和化工株式会社 環境微生物学研究所
	工藤　俊章	長崎大学 水産学部

評議員（５０音順、敬称略）

秋野 利郎	ゴーテック株式会社
五十嵐 泰夫	東京大学大学院 農学生命科学研究科
石野 園子	九州大学大学院 農学研究院
伊藤 進	琉球大学 農学部
伊藤 佑子	創価大学 工学部
今中 忠行	立命館大学 生命科学部
大島 敏久	九州大学大学院 農学研究院
鎌形 洋一	独立行政法人産業技術総合研究所
河原林 裕	九州大学大学院 農学研究院
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
小林 良則	財団法人バイオインダストリー協会
佐上 博	東北大学 反応化学研究所
芝 弘孝	サントリービジネスエキスパート株式会社
菅原 秀明	国立遺伝学研究所
鈴木 健一朗	独立行政法人製品評価技術基盤機構
中川 和倫	愛媛県立今治西高等学校
長田 洋子	日本大学 理工学部
南部 滋郎	日本赤十字九州国際看護大学 看護学部
長谷川 功	日本大学 生物資源科学部
半澤 敏	東ソー株式会社 東京研究所
別府 輝彦	日本大学 総合科学研究所
松井 裕	石川県立大学 生物資源工学研究所
丸山 正	独立行政法人海洋研究開発機構
山岸 明彦	東京薬科大学 生命科学部
湯本 勲	独立行政法人産業技術総合研究所
若木 高善	東京大学大学院 農学生命科学研究科
渡辺 公綱	東京薬科大学 生命科学部

幹事会

幹事長	中村 聡	東京工業大学大学院 生命理工学研究科
庶務	伊藤 政博	東洋大学 生命科学部
学術活動		
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
学会誌担当	石野 良純	九州大学大学院 農学研究院
学会誌担当	高品 知典	東洋大学 生命科学部
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
会計	宇佐美 論	東洋大学 理工学部
会計	道久 則之	東洋大学 生命科学部
HP 担当	三輪 哲也	独立行政法人海洋研究開発機構
HP 担当	為我井 秀行	日本大学 文理学部
シンポジウム担当	八波 利恵	東京工業大学大学院 生命理工学研究科
学術幹事	跡見 晴幸	京都大学大学院 工学研究科
学術幹事	伊藤 隆	独立行政法人理化学研究所
学術幹事	仲宗根 薫	近畿大学 工学部
学術幹事	國枝 武和	東京大学大学院 理学系研究科
学術幹事	青木 俊夫	日本大学 生物資源科学部
学術幹事	栗原 達夫	京都大学 化学研究所
学術幹事	福居 俊昭	東京工業大学大学院 生命理工学研究科
学術幹事	井上 明	東洋大学 生命科学部
学術幹事	亀倉 正博	好塩菌研究所
学術幹事	加藤 千明	独立行政法人海洋研究開発機構
会計監査	高瀬 光徳	森永乳業株式会社 栄養科学研究所
会計監査	伊藤 俊洋	財団法人北里環境科学センター

シンポジウム委員会

委員長	東端 啓貴	東洋大学 生命科学部
委員	仲山 英樹	長崎大学 環境科学部
	相馬 亜希子	千葉大学 園芸学部
	黄川田 隆洋	独立行政法人農業生物資源研究所
	峯岸 宏明	東洋大学 バイオナノエレクトロニクス研究センター
	鈴木 宏和	九州大学大学院 農学研究院
	小西 正朗	北見工業大学 工学部
	折田 和泉	東京工業大学大学院 生命理工学研究科

編　集　後　記

今年度の年会は東京世田谷の日本大学文理学部の地で開催されました。世田谷という地は、高級住宅街が立ち並ぶイメージがありますが、ここは、桜並木が続くとても静かな場所でもあります。春の桜の開花の季節になりますと、桜の名所としてお花見に訪れる人が絶えないところでもあります。年会会場として、新装の 3 号館の 5 階すべてを使わせていただき、通路すべてでポスター発表を行わせていただき、かなり贅沢な年会でもありました。270 名を超える年会参加者が見られ、大変活発な議論が展開されたのであります。当学会では、来年度から、東工大の中村聡先生を学会運営の中心者でもあります幹事長として迎え、若返った事務局体制で会員サポートを行っていく運びとなりました。私自身、学会誌編集担当として、中村新幹事長のもと息を合わせてがんばっていく所存ですので、今後とも会員各位との交流の生命線でもあります、本学会誌をよろしくお願い申し上げます。

学会誌編集担当幹事　加藤千明

編集委員会
委員長　：石井正治（東大）
副委員長：石野良純（九大）
委　　員：阿部文快（青学大）、伊藤　隆（理研）、鎌形洋一（産総研）、河原林裕（九州大）、高品知典（東洋大）、為我井秀行（日大）、中村　聡（東工大）、中村　顕（筑波大）、三輪哲也（JAMSTEC）、湯本　勲（産総研）

学会事務局
〒226-8501　横浜市緑区長津田町 4259-J2-13
東京工業大学　大学院生命理工学研究科
生物プロセス専攻　中村聡研究室内
極限環境生物学会事務局　中村　聡　(幹事会幹事長)
FAX: 045-924-5837　E-mail: kyokugenjm10@extremophiles.jp

学会誌編集
〒237-0061　神奈川県横須賀市夏島町 2-15
独立行政法人海洋研究開発機構　海洋・極限環境生物圏領域　(加藤千明、学術幹事)
TEL：046-867-9550　FAX：046-867-9525　E-Mail：kato_chi@jamstec.go.jp

発刊日　2012 年 12 月 31 日