

6 章 海洋生物資源研究の発展

深海探査船の開発により，世界中の海洋底のプレート境界や海嶺より 300℃以上の深海熱水孔が発見され，それらに生息する超好熱菌の多くが古細菌に属することから大きな注目を集めている．そして太陽エネルギーに全く依存しない深海熱水孔の生態系構築において，海洋底からもたらされる膨大な化学エネルギーや，様々な物質の微生物変換や生物生産過程に重要な役割を果たしている多様な超好熱菌の性状とその遺伝子資源としての価値に大きな関心が集まり研究が開始されている．

従来このような極限環境には限られた微生物のみが生息すると考えられてきたが，近年の16S rRNA 遺伝子を用いた分子系統解析により極めて多様な未知微生物群の存在が明らかになってきた．これまで分離された超好熱菌はほとんどが培養困難な嫌気性菌で研究の発展に障害となっていたが，環境ゲノムから直接遺伝子の探索，機能解析とその発現・利用を試みる研究が始まっている．超好熱菌は分子系統樹の根元に位置する種が多いため生命の起源と進化を探る最適生物であるばかりではなく，全ゲノム塩基配列の解析とも相まって未知の代謝系や触媒機能を有する未開拓の好熱遺伝子資源として益々重要性が増している．

6.1 海洋熱水環境の生態系と超好熱菌の多様性

海洋底プレートの形成域であるリフト系は，マントルの物質やエネルギーが地表にもたらされる場であり，海洋底の拡大と冷却により，地球内部から散逸する熱の約 2/3 が放出される．近年このようなプレート境界や海嶺より，大西洋中央海嶺(TAG マウント, 3640m)，

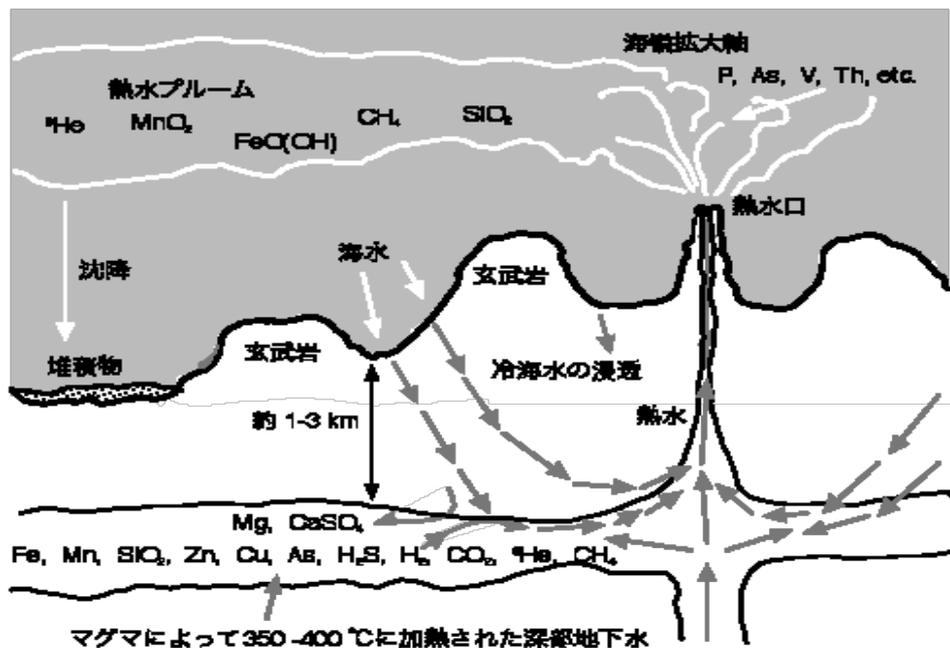


図 6.1. 海底熱水噴出孔の地球化学的環境

東太平洋海膨(2500m), 沖縄トラフ(1200m)や小笠原水曜海山(1300m)等多様な海底熱水孔が発見され地球化学的, 微生物学的研究が盛んである. その結果, 熱水噴出孔周辺には無脊椎動物や甲殻類を含む高密度で特異な生物群集を維持する生態系が存在することが明らかになってきた. 時に 300℃以上の熱水となり高濃度で還元性の強い H_2S , CH_4 , H_2 や重金属を含有し海水との混合により極めて多様な微環境が形成される. 図 4.6.1 には熱水活動域における化学反応過程を模式的に示した. 太陽光が到達しないため光合成に依存しない深海熱水生態系では, 熱水由来の H_2S や CH_4 等の還元物質を酸化し得る好熱性化学合成独立栄養細菌が一次生産を担っていると考えられている.

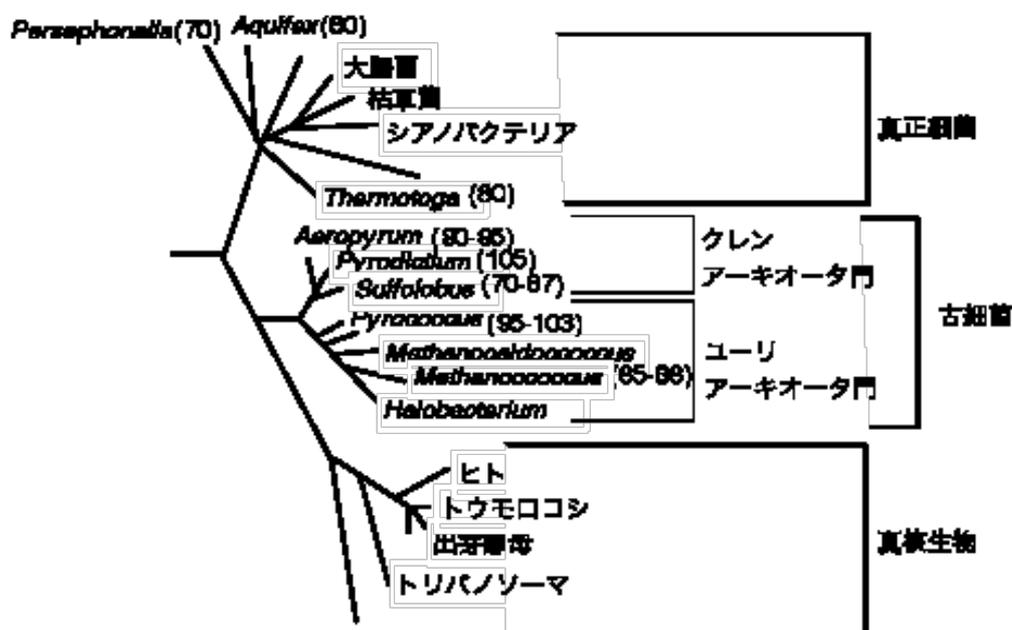


図 6.2. 全生物界の分子系統樹(Woese et al.,1990 を改変).
超好熱菌を含む枝には、()内に至適増殖温度を付記した.

超好熱菌とは, 至適増殖温度が 80℃以上の微生物群と定義されており, これまで 27 属 70 種以上の超好熱性メタン生成古細菌, 硫酸還元性古細菌, 硫黄代謝超好熱古細菌と, 真正細菌の *Thermotogales* 目, *Aquifex* 属が知られている. 図 4.6.2 は全生物界の分子系統樹と, 代表的な超好熱菌の系統関係を示したものである. 16S rDNA (リボソーム RNA 遺伝子) の塩基配列に基づく系統分類では古細菌はさらに 2 つの門, クレンアーキオータ (Crenarchaeota) とユーリアーキオータ (Euryarchaeota) に分けられ, 超好熱菌はその両方に含まれることから系統的にも生理的にも多様な微生物群である. 超好熱菌の大部分が嫌気性であるが, 一般にこれらの嫌気性菌は, 独立栄養的に増殖するか従属栄養的に増殖するかの違いはあっても, 分子状 H_2 を電子供与体とした S 呼吸によりエネルギーを獲得する代謝様式を持つものが多い. 嫌気性古細菌のうちで, *Desulfurococcus* 属, *Pyrodictium* 属, *Pyrococcus* 属および *Thermococcus* 属のいくつかの種は S^0 と H_2 の両方, あるいは S^0 または H_2 のどちらか一方の非存在下でも嫌気的に増殖し得ることから, 発酵代謝の経

路があることが示唆される。古細菌 *Aeropyrum* 属は絶対好気性の生物種のうちで最も増殖温度が高い(至適増殖温度: 90–95°C)。好酸性古細菌 *Sulfolobus* 属は pH2–3 において好氣的に増殖するが、独立栄養と従属栄養増殖がともに可能である。メタン生成古細菌は偏性嫌気性の独立栄養で、 H_2+CO_2 、ギ酸、酢酸、メタノール、メチルアミンなどから CH_4 を生成する。真正細菌の *Aquifex* 属は好熱性の水素細菌である。これまで分離されてきた超好熱菌の大部分は古細菌に属しそのほとんどが嫌気性でありまた海洋由来である。高温かつ嫌気性という培養の煩雑さや増殖の遅さと低収量から、多様性と新規性を有しながら研究や利用上問題となっていた。

従って極限環境に生息する微生物群を網羅的に単離・培養し、その性状から分類を行って生態系を解明することは極めて困難であった。そこで近年熱水孔の熱水や底泥試料から直接 DNA を抽出して、16S rRNA 遺伝子を PCR 法により増幅して分子系統解析を行い難培養性の好熱菌の生態系を明らかにする研究がなされてきた。その結果、*Thermococcus*, *Pyrococcus*, *Pyrobaculum* などの嫌気性超好熱古細菌由来の rDNA が優先するものの、未知の好熱古細菌由来の rDNA や分岐の根の深い未知真正細菌由来の rDNA が検出され極めて多様であった。今後は特異的な DNA プローブを用いた蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション(FISH)法や Real time PCR 法などによって、視覚・定量化による証明が急務である。また培養が困難な場合は、生息環境全体の DNA ライブラリーを構築して有用遺伝子の検索、発現、開発が必要と考えられる。

6.2 超好熱菌の全ゲノム塩基配列解析

昨今の超好熱菌ゲノム解析の進行は、研究戦略の面でも研究手法の面でも新時代の到来を予感させるものがある。その背景には、超好熱菌の遺伝情報の全てであるゲノムを断片的にではなくゲノム全体として取り扱い、その生物機能的側面からの解析を体系的かつ網羅的に行うことによって、ゲノム全塩基配列データを生物学的に意味のあるものに統合していこうという考え方がある。系統樹の根元に位置する超好熱菌が代謝・増殖・環境応答・

表 6.1. 全塩基配列解析が終了した代表的な超好熱菌ゲノムの特徴

生物種	ゲノムサイズ (Mbp)	総遺伝子数 ^a	機能未知遺伝子の数 ^b	ユニークな 遺伝子 ^c
古細菌				
クレンアーキオータ界				
<i>Aeropyrum pernix</i> K1	1.67	1,892(0.88)	959(51%)	649(34%)
<i>Pyrobaculum aerophilum</i> IM2	2.22	2,695(0.82)	n.e.	n.e.
<i>Sulfolobus solfataricus</i> P2	2.99	3,033(0.99)	1,510(50%)	1,068(35%)
ユーリアーキオータ界				
<i>Archaeoglobus fulgidus</i> DSM4304	2.18	2,437(0.89)	1,315(54%)	533(22%)
<i>Methanococcus jannaschii</i> DSM2661	1.66	1,772(0.94)	826(47%)	352(20%)
<i>Pyrococcus horikoshii</i> OT3	1.74	1,850(0.94)	850(46%)	403(22%)
<i>Methanopyrus kandleri</i> AV19	1.69	1,729(0.97)	n.e.	n.e.
真正細菌				
<i>Thermotoga maritima</i> MSB8	1.86	1,877(0.99)	660(35%)	322(17%)
<i>Aquifex aeolicus</i> VF5	1.50	1,580(0.99)	466(29%)	208(13%)

a. ()内は1遺伝子あたりのゲノムサイズ(kbp)

b. 相同性検索の結果、機能が推定できない遺伝子数。()内は総遺伝子に対する割合

c. 他生物に相同遺伝子が見いだされない遺伝子数。()内は総遺伝子に対する割合

n.e. not estimated

極限環境への適応などの諸機能においていかに常温性の真正細菌や真核生物と異なる生命システムを有しているかを解明するために、またゲノムに潜在する未開拓有用遺伝子資源の開発において、ゲノム解析の成果が威力を発揮するのではないかと期待されている。

表 4.6.1.に、既に全塩基配列の解析が終了した代表的な超好熱菌ゲノムで、そのデータが公表されているものの特徴を示した。ゲノムサイズはおよそ 1.5–2Mbp であり、大腸菌(4.6Mbp)、枯草菌(4.2Mbp)、シアノバクテリアゲノム(3.6Mbp)に比較して小さいと言える。また 1 遺伝子当たりの平均ゲノムサイズが全て 1kbp を下回り、ゲノムの上に稠密に遺伝子が分布していることがうかがえる。好気性の超好熱菌 *Aeropyrum pernix* ゲノムには機能未知遺伝子が 51%に達し、他生物に相同遺伝子が見出されない遺伝子の割合は 34%にものぼる。

全ゲノム塩基配列の解読が終了した超好熱菌において今後の最大の課題は、機能未知遺伝子群をいかに効率的にゲノム規模で同定し、有用遺伝子の発現・開発を行うことである。

6.3 好熱遺伝子資源の開発

これまでおよそ 70 種以上の超好熱菌が分離されている。これらの生産する有用耐熱酵素は近年多く報告され始めたが、遺伝子増幅(PCR)に必須の DNA ポリメラーゼ、タンパク質を分解するプロテアーゼや多糖を分解するグリコシダーゼ等がほとんどであり、また生産菌も限られている。これは培養条件の困難さ、細胞収量や増殖率の低さに起因する。表 4.6.2.には、現在商品化されている酵素(計画中も含む)をまとめたものである。いずれも使用可能温度が 80°C以上で、極めて強い耐熱性を有しており、将来的にはゲノム科学、医学、合成化学、食品加工や環境修復等の広範囲の分野に利用が期待されている。また酵素のみならず好熱微生物群そのものを用いた高温型排水浄化が事業化されており、エネルギー変換や生産、環境修復やバイオテクノロジーへの可能性も有望視されている。

また培養困難な微生物群についても、画期的な微生物単離法である光ピンセットを用いたレーザーマニピュレーションシステムを使った新規好熱菌の分離法が開発され始め、従来培養が困難と考えられてきた微生物の分離・培養が徐々に可能となってきている。一方で、分子生物学、遺伝学的方法論が押し進められ、ある種の海産のカイメンと共生する培養出来ない古細菌に対して、カイメンを含む古細菌の天然試料から直接 DNA を抽出し、

表 6.2. 超好熱菌の利用可能な代表的酵素

酵素名	目的	商品化	使用温度(°C)	種名
DNA ポリメラーゼ (多種類)	遺伝子工学 (PCR 法)	済	70~80	<i>Pyrococcus furiosus</i> <i>Pyrococcus</i> sp. <i>Thermococcus kodakaraensis</i>
DNA リガーゼ	遺伝子工学	済	70	<i>P. furiosus</i>
ホーミングエンドヌクレアーゼ (数種類)	遺伝子工学 (ゲノムマップ)	済	80~90	<i>Aeropyrum pernix</i> 他
アミノペプチダーゼ (数種類)	蛋白質の アミノ酸配列分析	済	75	<i>P. furiosus</i>
β-グルコシダーゼ (数種類)	糖鎖構造解析	済	90	<i>P. furiosus</i> 他
α-グルコシダーゼ (数種類)	糖鎖構造解析	未	75~125	<i>Pyrococcus</i> spp. <i>Thermococcus</i> spp. 他
プロテアーゼ (多種類)	食材料加工 難分解物の分解	未	75~125	<i>P. furiosus</i> , <i>A. pernix</i> , <i>Thermococcus</i> sp. 他

古細菌 DNA のみを増幅してその遺伝情報から微生物本体の生理機能や代謝的特徴を探るという技術が確立された。これらの方法論の確立は、培養困難な未知微生物からの遺伝子資源の利用・開発を含めた環境ゲノム工学の可能性を切り開くものである。実際これらの研究の基本的概念は米国ベンチャー企業の環境ゲノム工学用のオートメーションロボットに取り入れられ、環境中の有用遺伝子資源の開発に利用されている。

さらにゲノム解析の新しいテクノロジーとして注目されている DNA チップを用いたゲノム遺伝子構造やその機能の解析を応用し、環境試料から直接抽出したヘテロな微生物群集の遺伝子構造や機能について解析する試みも行われつつある。こうした培養に依存しない遺伝子情報の解析は極めて多様な代謝、酵素活性、環境修復能を持った微生物群集に存在する無限の遺伝子資源の開発、利用にも役立つことが期待されている。

(左子芳彦)

【参考文献】

京都大学農学部編：京大人気講義シリーズ バイオサイエンスの新戦略 丸善株式会社
東京 2004

石田祐三郎・杉田治男（編）：海の環境微生物学 株式会社厚生社厚生閣 東京 2005