

身近で活躍する有用微生物 環境と有用微生物6.

海洋の極限環境微生物を環境保全に応用

いしだまさみ
石田真巳
Masami ISHIDA

はじめに

地球上には、火山周辺、極海、深海、塩湖などの様に、高温、低温、高圧、高塩濃度、高アルカリなどの極端に偏った物理的・化学的環境が存在する。普通の生物が生息できない、これらの極限環境にも、各環境に適応し、その環境を好んで生息する極限環境微生物がいる。極限環境微生物は、好熱菌 thermophiles、好冷菌 psychrophiles、好アルカリ菌 alkaliphiles、好酸菌 acidophiles、好圧菌 piezophiles、好塩菌 halophiles 等、各々の環境を好む (-philes は愛するの意) 微生物群が主に含まれている。また、高い放射線に耐える放射線耐性微生物など、極限環境に「耐える」ものも含まれる。1973年に極端な (extreme) 環境を好む生物全体をまとめる extremophiles (極限環境微生物) という名称が使用され、その後、乾燥耐性をもつクマムシやユスリカなど微生物でない生物も含めて極限環境生物ともいわれる。極限環境微生物やその酵素の応用・利用では、好熱菌のDNAポリメラーゼによるPCRや好アルカリ菌のセルラーゼの洗剤配合などが良く知られている。本稿では、海洋の低温環境、高圧環境に適応する極限環境微生物である好冷菌、低温菌、耐圧菌、好圧菌とそれらの酵素について解説し、筆者が行っている環境保全を目指す研究の一部を紹介する。

I. 海洋の低温・高圧環境に生息する 極限環境微生物

1. 好冷菌・低温菌

海洋には、北極海や南極海を始めとする高緯度海域や深海など、温度の低い環境がある。こうした低温環境には、低温に適応した好冷菌や低温菌が生息している。一般に、0℃付近で増殖する微生物を低温適応微生物と呼ぶ。さらに、Morita¹⁾が示した最適生育温度の違いを主な判断基準とする区分がよく用いられ、0℃付近(0℃以下も)で生育する微生物の内、最適生育温度が15℃以下で最高生育温度が20℃程度までのものを好冷菌 psychrophiles とし、最適生育温度が15℃より高いものを低温菌 psychrotrophs とする。psychrotroph という用語は、低温を食べるような意味なので不自然だが、伝統的に広く用いられてきた。現在では、低温菌を psychrotolerant microorganisms (耐冷性の微生物の意) と呼ぶこともある。また、低温適応微生物全体を psychrophiles と呼ぶこともある。好冷菌は、南極海・北極海や深海など、常に低温である環境に生息しており、低温菌は、南極海・北極海や深海にも、水温の季節変動がある寒海にも生息している。

海洋の低温適応微生物には、*Pseudomonas* 属、*Pseudoalteromonas* 属、*Vibrio* 属、*Allivibrio* 属、*Shewanella* 属、*Photobacterium* 属をはじめ多種のものが含まれ、同じ属内に種や株の違いによって常温菌と低温菌、低温菌と好冷菌が存在することが多い。低温適応微生物に特徴的な低温適応機構をいくつかあげると、細胞膜の脂質組成は、低温環境でも膜の流

動性を維持するため、飽和脂肪酸より融点が高いオレイン酸などの不飽和脂肪酸が多く含まれており、脂肪酸の分岐、脂肪酸鎖長を短くする等の特徴もある²⁾。また、イコサペンタエン酸など多価不飽和脂肪酸を持つものもある³⁾。低温で生ずる mRNA の不必要な二次構造をほどく RNA シャペロンなど、様々な cold-shock タンパク質 (低温ショックによって合成されるタンパク質) も存在する⁴⁾。酵素については II-1 で示す。

2. 好圧菌・耐圧菌

地球の海洋の平均深度は約 3,800 m であり、海洋の大部分は低温・高圧の極限環境である。「深海」には統一された定義はないが、光合成と呼吸が等しくなる深度 200 m より深い領域を深海と呼ぶことがよくある。海洋学研究では、0 ~ 200 m を表層、200 ~ 1,000 m を中層、1,000 ~ 4,000 m を漸深層、4,000 ~ 6,000 m を深海層という区分を用いることが多い。深度が 10 m 増えると水圧は約 0.1 MPa (約 1 気圧) 上がるので、深度 1,000 m なら水圧は 10 MPa (100 気圧) になる。高緯度の海域では、水温は、海表面から低温で、海底まで 4°C 程度で一定している。一方、中緯度~低緯度の海域では、表層の温度は海域によって異なるが、深度 200 m になると 10 ~ 20°C 程度になり、深度が増すと共に水温が低下して 1,000 m では 4°C 程度になる。それより深くなると海底まで 4°C 以下で一定している。

一般に陸上の常圧菌は、常圧 (大気圧) から圧力が上昇するにつれて増殖速度が低下し、30 ~ 50 MPa で生育しなくなる。それに対して海洋の耐圧菌 piezotolerant microorganisms は、明確な定義はないが、常圧が最適で、圧力が上がっても増殖速度が常圧と同程度であり、さらに高圧になると増殖速度が低下していく。一方、深度の深い深海層などには、高圧の方が常圧より増殖速度が速い好圧菌 piezophiles (通性好圧菌 facultative piezophiles とともいう) も生息しており、*Moritella* 属、*Colwellia* 属、*Photobacterium* 属、*Shewanella* 属、*Psychromonas* 属等が知られている⁵⁾。マリアナ海溝底の様な非常に高圧の環境からは、常圧では生育しない偏性好圧菌 obligate piezophiles も見つまっている⁵⁾。また、海底熱水噴出孔周辺から超好熱菌の新種として、偏性好圧菌 *Pyrococcus yayanosii* が単離されている⁶⁾。大

部分の海洋は低温環境なので、好圧菌・耐圧菌の殆どは、低温適応微生物である。

好圧菌・耐圧菌の低温適応機構は、I-1 で示した好冷菌・低温菌の場合とよく似ているが、高圧適応の分子機構は分かっていることが少ない。Abe⁷⁾は、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の多数のノックアウト変異株で圧力適応に関係する遺伝子を明らかにしたことを中心に、圧力生理学を提唱している。

II. 海洋の低温・高圧環境の微生物がもつ酵素

1. 低温適応酵素

好冷菌・低温菌の酵素は、図 1 のように、常温生物の酵素 (図中の点線 ………) と比べて、安定性が低く低温活性が高いもの (図中の一点破線 - - - -) から、安定性を維持しながら低温活性が高いもの (図中の実線 —) までであると考えられる。Feller は総説⁸⁾の中で、好冷菌 (低温菌を含む) の酵素の特徴は、常温生物酵素と比べて、0°C 付近などの低温域で比活性が高いことと、最適温度が低温側に移動していることであるとしている。確かに、好冷菌・低温菌の酵素は常温生物酵素より低温での比活性が高い。一方、最適温度の低温側への移動は熱安定性の低下を意味するが、熱安定性の低さは、低温環境で酵素が正しい立体構造になるために必要な folding にも関係がある。低温菌 *Shewanella frigidimarina* のトリプトファン合成酵素は、大腸菌の同酵素と比べて、低温での活性は高いが、熱安定性は殆んど変

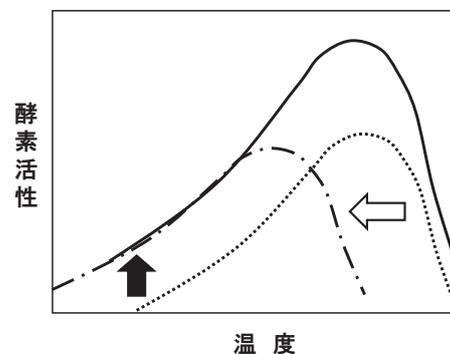


図 1 好冷菌・低温菌の低温適応酵素の温度特性

—: 熱安定性を保持した低温適応酵素、
- - -: 熱安定性の低下した低温適応酵素、
……: 常温生物の酵素

わらない⁹⁾。好冷菌・低温菌の酵素利用でも、低温活性の高さをメリットとしている例（低温で使える洗剤のプロテアーゼ、低温で乳糖分解する β -ガラクトシダーゼなど）と、安定性の低さをメリットとしている例（遺伝子組換え実験やPCRで使用する酵素）がある⁸⁾。

好冷菌・低温菌に由来する酵素の構造の特徴は、立体構造解析された酵素の構造からみると、分子内部の疎水性・イオン対・水素結合の減少、 α ヘリックスの不安定化、エントロピー的安定性の減少などが認められ⁸⁾、好熱菌由来耐熱酵素の熱安定化をもたらす構造の特徴と概ね逆である。

2. 高压適応酵素

酵素の圧力特性には図2の様な種類がある。常圧生物の酵素は、圧力上昇につれて活性が低下するものが多い。一方、好圧菌や耐圧菌の酵素は、圧力が上昇しても活性が低下しない耐圧性を示す。酵素によっては、常圧の活性より高压の活性の方が高くなる好圧性を示すものもある。大前ら¹⁰⁾は、酵素基質複合体の基底状態と励起状態の体積変化である「活性化体積 ΔV^\ddagger 」と圧力特性との関係を示している。酵素の反応速度は、 $\Delta V^\ddagger > 0$ だと加圧で減少し、 $\Delta V^\ddagger < 0$ だと加圧で増大する。好圧性酵素では、常圧から加圧で活性が上昇して極大になるまでの圧力範囲では $\Delta V^\ddagger < 0$ 、さらに加圧して活性が低下する範囲では $\Delta V^\ddagger > 0$ となる。これに対して、常圧菌の非耐圧性酵素では、常圧～高压の全範囲で $\Delta V^\ddagger > 0$ となる。 ΔV^\ddagger は、酵素分子内の空隙や酵素基質複合体の水和状態も含む体積変化なので、高压適応酵素の構造の特徴は、空隙や水和状態の違いに関係するかもしれない。Hamajama et al¹¹⁾は、酵素の耐圧性をもたらす分子機構を報告している。好圧菌 *Shewanella*

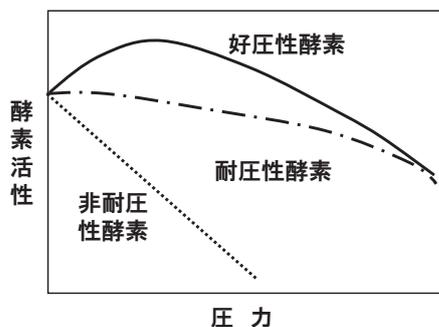


図2 耐圧菌・好圧菌の高压適応酵素の圧力特性

benthica と常圧菌 *Shewanella oneidensis* 由来の酵素 3-isopropylmalate dehydrogenase (IPMDH) を比べると、226番目の残基が好圧菌酵素ではAla（アラニン）、常圧菌酵素ではSer（セリン）であった。加圧下での結晶解析（図3）では、この部位がSer（側鎖にOH基があって親水性）だと3分子の水（図中の小さな黒丸）がクラスターになって結合し、酵素反応に必要なドメインの開閉が阻害された。この部位がAla（側鎖はメチル基）だと加圧下でも水分子クラスターは結合せず、ドメインが開閉して活性が維持された。各IPMDHの226番のSerとAlaを入れ替えると相手の酵素と同じ圧力特性に変わり、この部位の重要性が示された。この結果は、高压適応に特有の仕組みの一つと考えられる。

Ⅲ. 極限環境微生物と酵素の環境保全への応用

1. 海藻多糖類分解酵素

現在、地球温暖化防止のため、化石燃料への依存度を減らし、CO₂などの温室効果ガスの排出量を削減する必要がある。対策の一つに植物から製造するバイオマス燃料で、カーボンニュートラルなエネルギーであるバイオエタノールがある。農地に限られている日本では、農作物をバイオエタノールの原料に使うと食糧競合状態になる。世界第6位の排他的経済水域を有する日本では、未利用バイオマスとして海藻がある。中でも褐藻は、繁殖量が多く、食用

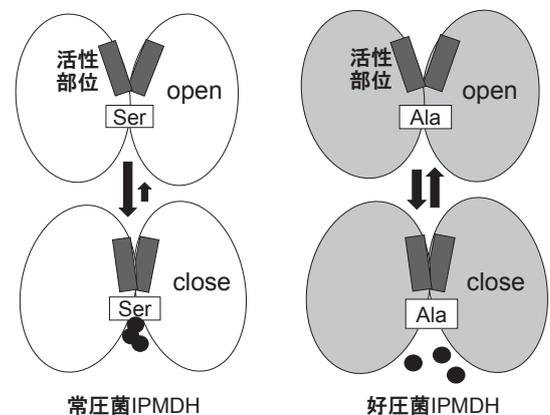


図3 好圧菌の耐圧性IPMDHと常圧菌の非耐圧性IPMDHの分子構造の違い

IPMDHはopen形とclosed形の間を開閉しながら反応する。図中のSerとAlaは酵素の226番目のアミノ酸残基。

にしないものも多い。褐藻がもつ主な多糖類には、藻体を成すセルロース、防御等に働くアルギン酸やフコイダン、そして貯蔵物質のラミナランがある。陸上植物や緑藻はデンプンを貯蔵するが、褐藻は β -1,3-結合でグルコースが連なったラミナランを貯蔵する。ラミナランには、由来する褐藻の種類によって β -1,6-結合が含まれる等の構造の多様性がある。

バイオエタノールは主に出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (以下、酵母と表記) によるエタノール発酵で生産される。酵母は多糖類を分解できず、単糖グルコースや二糖マルトース等しか食べないので、原料の多糖類を「糖化(単糖等に加水分解)」する必要がある。筆者らの研究室では、様々な酵母の探索も行ってきたが、ここでは糖化酵素について述べる。海外ではバイオエタノール生産のために、酸や高温加熱でデンプンを加水分解するのが主だが、筆者らは、糖化と発酵を同一容器で行う並行複発酵で環境負荷が少ないバイオエタノール生産を考えている。ラミナランは、細菌、真菌、巻貝などがもつ酵素ラミナラーゼによって糖化される。酵母のエタノール発酵効率は25℃前後で高いので、温度特性が合うラミナラーゼを探索し、酵母に遺伝子導入して表層提示させるか、酵素を固定化して酵母と混合させれば並行複発酵が可能であろう。まず、 β -1,6-結合が10%程度と少ないコンブのラミナランを基質として分解低温菌を探索し、最適生育温度25℃の低温菌 *Pseudoalteromonas* sp. LA 株を得た。LA 株からラミナラーゼ (LA-Lam) を精製し、遺伝子を分析した結果、未知の基質結合ドメインを複数もつ酵素であることが分かった¹²⁾。図4の様に、市販の常温性真菌 *Trichoderma* 由来ラミナラーゼは最適温度が55℃であり、40℃になると活性が50%まで低下したのに対して、LA-Lam は最適温度が45℃であり、酵母の発酵温度25℃で50%の活性を示し、並行複発酵可能と思われた。しかし、LA-Lam は β -1,6-結合を25%程度含むアラメのラミナランを全く分解せず、ラミナラーゼ利用のポイントに基質特異性があると分かった。そこで、基質特異性の広いラミナラーゼを求めてアラメのラミナランを分解する低温菌を探索し、コンブ、アラメ両方のラミナランを分解するラミナラーゼを生産する低温菌を得た。現在、この酵素が並行複発酵に有効か検討している。

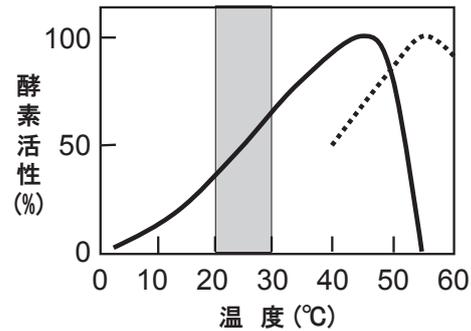


図4 低温菌 *Pseudoalteromonas* sp. LA 由来ラミナラーゼの活性の温度依存性

— : 低温菌のラミナラーゼ、
 : 常温性真菌のラミナラーゼ
 灰色の温度域 (20℃~30℃) :
 酵母のエタノール発酵効率が低い温度域

2. タンパク質分解酵素

プロテアーゼやリパーゼには様々な利用可能性があり、新たな基質特異性等をもつ新規酵素の探索が続いている。筆者らの研究室でも海洋の低温環境、高圧環境から新規のプロテアーゼやリパーゼの探索を続けてきた。その結果の一つとして、相模湾の深度320 mからポンプで汲み上げられた15℃の海水(神奈川県三浦市)からプロテアーゼを生産する低温菌 *Vibrio* sp. Pr21 株を得た。この酵素 (PR プロテアーゼ) は、25℃でも10℃でもミズクラゲを良く分解した¹³⁾。当初、この酵素を環境保全に利用することを意図したが、350 MPa (海の深度に換算すると3万5千 m 相当) の高圧でも大気圧下と同程度の活性を示す高い耐圧性があり、200 MPa に極大がある好圧性も示すことが分かった。

もし、酵素活性を圧力でコントロールできたら発酵生産の制御等に変大有効であると思われるが、酵素の耐圧性・好圧性の仕組みや設計につながる様な人工改変については既知の情報が非常に少ない。そこで、どこのネジを緩めたり締めたりすると圧力特性が変わるかアミノ酸置換で調べることにした。進化学によって好冷菌プロテアーゼを熱安定化した報告¹⁴⁾ にならい、PR プロテアーゼ遺伝子にランダム変異を加えて、活性の変化を手掛りに変異酵素を探した。その結果、野生型酵素より活性が約3倍上がり、好圧性が増大して耐圧性が低下した Q301P 変異酵素が得られた。この変異酵素では、野生型酵素の Gln (グルタミン)-301 が Pro (プロリン) に置

換していた。図5の様に、Gln-301は、活性部位の基質結合ポケットの近くにある β シート（図5では黒色の部分）上にあり、他のドメイン（図5では濃い灰色の部分）上にあるAsn（アスパラギン）-234と水素結合によって β シートを結びつけていた。Q301P変異酵素では、GlnからProへのアミノ酸置換によってこの水素結合が欠失したために β シートの動きが柔軟になり、耐圧性や好圧性の違いが生じたと考えられた¹⁵⁾。PRプロテアーゼの高い耐圧性には複数の部位が関係していると考え、現在、進化学で耐圧性に影響する他の部位の変異も探している。

3. 生分解性プラスチックの分解微生物

現在、海洋のプラスチックごみ汚染は、地球規模の環境問題である。海洋に流出したプラスチック容器等が紫外線や波の力などで破碎・劣化し、細片化されたマイクロプラスチック MPs になって海中を沈降し、汚染は深海底にまで及ぶ深刻な状況である。比重が軽いポリプロピレンやポリエチレンなども細片化しながら藻類等の付着によって比重が増加し、深海底にまで沈降する。プラスチックは疎水性なので海水中の残留性有機汚染物質 POPs（PCB や内分泌攪乱物質など）を吸着し、小さな海洋生物に摂食され、食物連鎖によって人間が食べる水産物に及ぶと考えられ、食の安全が危惧されている。しかし、石油由来のプラスチックは非常に優れた物性や価格（安価）のために社会の様々な場面で使われ、使用量を減らすことはできてもゼロにするのは困難と思われる。近年、自然環境で微生物に分解・消費される生分解性プラスチックに注目が集まっている。こ

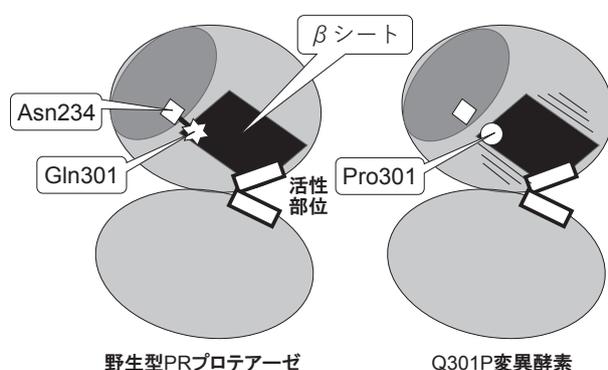


図5 低温菌PRプロテアーゼの野生型酵素とQ301P変異酵素の分子構造の違い

れまでに開発されている生分解性プラスチックには、ポリカプロラクトンPCL（農業用マルチフィルムなどに使用）やポリ乳酸PLA（農業用シートや食品トレーなどに使用）の様に石油やバイオマスを原料として化学合成したもの、P（3HB）等のポリヒドロキシアルカン酸類PHAの様に微生物がエネルギー貯蔵物質として生産したもの等があり（図6）、大部分がポリエステル構造を持っている。従来、実用化されている生分解性プラスチックの分解性能は、土壌や淡水等の陸上環境で評価され、海水中での分解性能は悪いものが多く、PLAは海水中では殆んど分解されない。PHAの一種であるPHBH（copolymer of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyhexanoate）（図6）は海水中の分解性が認められている。また、千島海溝や日本海溝の底泥からPCLを分解する好冷性好圧菌が発見されている¹⁶⁾。種々の生分解性プラスチックについて、現在、海洋分解性を改良するための研究が行われている。

現在、海水中で分解する生分解性プラスチックの認証制度としてTUV AUSTRIAによる“OK biodegradable MARINE”があり、30℃の海水中で生分解度が6か月以内に90%以上、等のことを示す認証として、認証取得のための試験が行われている。海水中のMPsが低温・高圧の環境を沈降して深海底に蓄積していることから、石油系プラスチックに代替可能な性能の生分解性プラスチックを開発・改良していくためには、低温・高圧の海洋環境における分解微生物・分解酵素の情報が必要と思われる。低温・高圧環境の微生物がもつ分解酵素の立体構造が分かれば、より分解しやすい構造にプラスチック側を改良することもできるかもしれない。こうした観点から筆者らの研究室では、表層の海中浸漬による

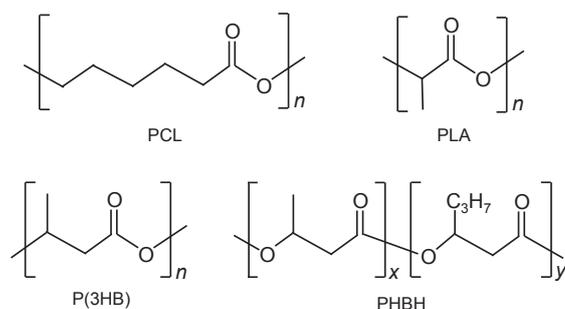


図6 市販されている生分解性プラスチックの構造（代表的なものの一部）



図7 東京海洋大学の練習船神鷹丸に搭載されている
ニスキン採水器付 CTD

上方に並んだ縦長なのが採水ボトル、下方にあるのが温度、深度、塩分などの測定装置。写真は、これから海中にケーブルでCTDを下すところ。

分解試験のみでなく、海洋中層を中心とした低温・高圧環境における生分解性プラスチックの分解微生物を探索し、分解酵素の解明を目指している。このための方法として、筆者の所属大学の練習船等によって様々な海域に行き、鉛直方向の温度、圧力、塩濃度などを測定する装置 CTD (conductivity temperature depth profiler) (図7) を利用している。船上から CTD をケーブルで海中に下す。CTD には採水ボトルが装着されており、船上から信号を送って各深度の海水を別々のボトルに採取することができる。この採水器で各観測点の深度 200 ~ 1,000 m の海水を採取し、海水中の微生物を低温で培養して、分解微生物の種類や分解能を分析している。分解微生物の海洋中の水平方向・鉛直方向の分布にどんな意味があるか明らかにしたい。また、分解酵素についても常温・常圧の分解菌が持つ酵素との違いも含めて特徴を明らかにしたい。

未公表データがあり、結果を十分にお伝えできないことをご容赦ください。

おわりに

皆様は、海洋の大部分が低温・高圧の環境であり、低温適応・高圧適応した極限環境微生物が生息していることをご存じでしたか。基礎的な理解という意味では、低温適応の微生物学や生化学は説明できることが随分多くなり、高圧適応も説明できることが

増えつつあります。利用・応用は、まだ例が少なく、これからだと思います。一方、地球温暖化による荒天の頻発、海洋プラスチックごみ汚染などが確実に進み、SDGs の目標 14「海の豊かさを守ろう」も提言され、環境保全の対策が急務です。フラスコや水槽の様な限定された環境と違って、海は広大で、しかも低温・高圧の環境です。持続的な環境保全のためには、海で暮らす微生物の生態や能力を良く学び、ここまでは人間が合わせるから、ここから先は微生物さん頼むよ、という共存がゴールにつながるのではないのでしょうか。

謝 辞

今回紹介させていただいた環境保全への応用のほとんどは、東京海洋大学 海洋資源環境学部 海洋環境科学科 海洋生化学研究室で行いました。ご協力頂いた先生方、一緒に実験してくれた卒業生・学生の方々、ご協力頂いた企業の方々に感謝いたします。海水試料採取にご協力頂いた同大学練習船乗組員の方々にも感謝いたします。また、深海微生物についてご指導頂いた加藤千明先生(元・海洋研究開発機構、現・NPO 法人チームくじら号)、加藤先生の研究室の方々に御礼申し上げます。

文 献

- 1) R. Y. Morita (1975) Psychrophilic bacteria. *Bacteriological Rev.* 39(2), 144-167.
- 2) N. J. Russel (2008) Membrane components and cold sensing. *In Psychrophiles from Biodiversity to Biotechnology* (eds. R. Margesin, F. Schinner, J.-C. Marx, C. Gerday), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp 177-190.
- 3) 栗原達夫, 川本純, 江崎信芳(2009)好冷性細菌の低温適応に関わるタンパク質とリン脂質. *生化学* 81(12), 1072-1079.
- 4) S. Phadtare and M. Inouye(2008) Cold-shock proteins, *In Psychrophiles from Biodiversity to Biotechnology* (eds. R. Margesin, F. Schinner, J.-C. Marx, C. Gerday), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 191-209.
- 5) 加藤千明(2013)深海微生物の圧力耐性機構. 進化する食品高圧加工技術(重松 西海監修), エヌ・ティー・エス, 東京 pp. 65-84.
- 6) J.-L. Birrien, X. Zeng, M. Jebbar, et al.(2011)*Pyrococcus yayanosii* sp. nov., an obligate piezophilic hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61(12), 2827-2831.
- 7) F. Abe(2007)Exploration of the effects of high hydro-

- static pressure on microbial growth, physiology and survival: Perspectives from piezophysiology. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**(10), 2347-2357.
- 8) G. Feller (2013) Psychrophilic enzymes: from folding to function and biotechnology. *Scientifica* **2013**, Article ID 512840.
 - 9) D. Mitsuya, S. Tanaka, H. Matsumura, et al. (2014) Strategy for cold adaptation of the tryptophan synthase α subunit from the psychrophile *Shewanella frigidimarina* K14-2: crystal structure and physicochemical properties. *J. Biochem.* **155**(2), 73-82.
 - 10) 大前英司, 宮下友里奈, 加藤千明 (2016) 酵素の構造安定性と機能におけるキャビティーと水和の役割—深海微生物由来酵素からの治験—*Netsu Sokutei* **43**(2), 59-65.
 - 11) Y Hamajima, T Nagae, N Watanabe, et al. (2016) Pressure adaptation of 3-isopropylmalate dehydrogenase from an extremely piezophilic bacterium is attributed to a single amino acid substitution. *Extremophiles* **20**, 177-86.
 - 12) D. Mitsuya, T. Sugiyama, S. Zhang, et al. (2018) Enzymatic properties and the gene structure of a cold-adapted laminarinase from *Pseudoalteromonas* species LA. *J. Biosci. Bioeng.* **126**(2), 169-175.
 - 13) M Ishida, C Yoshida-Mishima, Y Maeda, et al. (2016) Purification and enzymatic properties of a neutral metalloprotease produced from the cold-adapted *Vibrio* species Pr21 isolated from deep seawater in Sagami Bay, Fish. Sci. **82**(4), 675-683.
 - 14) K. Miyazaki, P. L. Wintrode, R. A. Grayling, et al. (2000) Directed evolution study of temperature adaptation in a psychrophilic enzyme. *J. Mol. Biol.* **297**(4), 1015-1026.
 - 15) M. Okai, C. Onoue, R. Tsuda, et al. (2020) Q301P mutant of *Vibrio* PR protease affects activities under low-temperature and high-pressure conditions. *J Biosci Bioeng*, **130**(4), 341-346.
 - 16) T. Sekiguchi, T. Sato, M. Enoki, et al. (2010) Isolation and characterization of biodegradable plastic degrading bacteria from deep-sea environments. *JAMSTEC Rep. Res. Dev.* **11**, 33-41.