

## 平成 16 年度科学研究費補助金 ( 基盤研究 ( S ) ) 研究状況報告書

|   |                |   |          |                         |        |                  |  |
|---|----------------|---|----------|-------------------------|--------|------------------|--|
| ふりがな  |                | いまなか ただゆき   |          |                         |        |                  |  |
| 研究代表者氏名   |                | 今中 忠行   |          | 所属研究機関・部局・職             |        | 京都大学・大学院工学研究科・教授 |  |
| 研究課題名   | 和文             | 超好熱始原菌 <i>T. kodakaraensis</i> KOD1 の全遺伝子機能解析   |          |                         |        |                  |  |
|   | 英文             | Total functional genomics of the hyperthermophilic archaeon, <i>T. kodakaraensis</i> KOD1 |          |                         |        |                  |  |
| 研究経費  | 平成14年度         | 平成15年度  | 平成16年度   | 平成17年度                  | 平成18年度 | 総合計              |  |
| 16年度以降は内約額<br>金額単位：千円   | 27,900         | 17,600  | 17,600   | 17,600                  | 8,800  | 89,500           |  |
| 研究組織 ( 研究代表者及び研究分担者 )   |                |   |          |                         |        |                  |  |
| 氏名  | 所属研究機関・部局・職    |   | 現在の専門    | 役割分担 ( 研究実施計画に対する分担事項 ) |        |                  |  |
| 今中 忠行   | 京都大学・工学研究科・教授  |   | 生物工学     | 研究総括                    |        |                  |  |
| 跡見 晴幸   | 京都大学・工学研究科・助教授 |   | 遺伝子工学    | 遺伝子破壊                   |        |                  |  |
| 福居 俊昭   | 京都大学・工学研究科・助手  |   | タンパク質化学  | 機能解析                    |        |                  |  |
| 金井 保  | 京都大学・工学研究科・助手  |   | 極限環境微生物学 | DNA chip                |        |                  |  |
| 当初の研究目的 ( 交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。 )   |                |   |          |                         |        |                  |  |
| <p>超好熱菌とは一般に 90 以上でも生育する微生物の総称である。超好熱菌は生物の進化系統樹の源流に位置しており、現存する生物の中で原始生命体に最も近いと考えられている。我々は、1993 年に鹿児島県小宝島の硫気孔より超好熱始原菌の 1 種 <i>Thermococcus kodakaraensis</i> KOD1 株を分離した。我々は KOD1 株について、</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ KOD1 株の全ゲノムの塩基配列決定(2,088,737 bp)</li> <li>・ 栄養要求性宿主と相補遺伝子を用いた特異的遺伝子破壊技術の開発</li> <li>・ KOD1 株の細胞内タンパク質を再現性よく分離・検出できる proteome 解析技術の確立を進めてきた。</li> </ul> <p>本研究ではこれらの技術・情報を基盤として KOD1 株ゲノム上に存在する全遺伝子の機能解析を目指している。具体的には個々の遺伝子について、</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>発現様式の解析 ( transcriptome/proteome 解析 )</li> <li>組換え型酵素の生化学的解析</li> <li>遺伝子破壊による遺伝学的解析</li> </ul> <p>を中心に進めている。</p> <p>上記 3 研究項目を進めることにより、我々は極めて単純な生命体である KOD1 株の生命維持メカニズムの解明に迫りたい。</p> |                |   |          |                         |        |                  |  |

これまでの研究経過（研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。）

本研究の進捗状況は以下の通りである。

#### 1) 全遺伝子の発現様式解析（Transcriptome 解析）

Transcriptome 解析に用いている DNA chip は *T. kodakaraensis* KOD1 株の genome annotation で明らかとなった 2306 個の遺伝子配列を元に作製されたものである。DNA chip 作製時に ORF 長が短かった等の理由で機械的に削除された遺伝子が 80 個存在するので、DNA chip 上には 2226 個の遺伝子（全遺伝子の 96.5%にあたる）がスポットされている。遺伝子の発現量を解析する際に用いた化学的・物理的パラメーターは、炭素源、エネルギー源、温度、酸化還元電位である。例えば炭素源については糖新生が必要となる環境と解糖が必要となる環境において KOD1 株を培養し、transcriptome の比較を行った。転写量が糖新生 / 解糖 > 4 であった遺伝子は 35 種類存在し、その内機能未知遺伝子が 20 種類同定された。逆に解糖 / 糖新生 > 4 であった遺伝子は 56 種類存在し、38 種類が機能未知であった。したがって、**KOD1 ゲノム上の機能未知遺伝子の内、58 種の遺伝子は炭素代謝と輸送およびその制御に関与することが示唆された。**現在個々の遺伝子についての解析を進めている。

#### 2) 遺伝子破壊系の改良

研究開始時は *pyrF* および *trpE* 遺伝子をマーカーとした遺伝子破壊系を開発していたが、本研究を通じて 3 個以上の遺伝子を破壊できる系の構築に成功した。Popping out 効率等を検討した結果、マーカー遺伝子の挿入による遺伝子破壊 → pop out によるマーカーの除去、を繰り返すことにより、**多数の遺伝子が同時破壊された株を作製することが可能となった。**

#### 3) 個々の遺伝子の破壊

今まで超好熱菌の遺伝子破壊が困難であったことから、個々の遺伝子の生理的役割の推定は全て *in vitro* 解析の結果に基づくものであった。本研究で我々は多数の KOD1 株の遺伝子を破壊し、より直接的な方法で個々の遺伝子の生理的役割を同定することができた。従来の *in vitro* 研究では解析困難な例を以下に示す。

我々は KOD1 株内に新型 fructose 1,6-bisphosphatase (Tk-Fbp) の存在を発見し、本酵素が基質に対して特異性の高い phosphatase であること、糖新生条件下でその発現量が増加すること、ゲノム解析が行われた全ての超好熱始原菌内に Tk-Fbp の orthologue が存在することを見出した。一方で、超好熱始原菌 *Methanococcus* や *Pyrococcus* などでは異なる遺伝子の産物である inositol monophosphatase (IMPase) が *in vitro* で高い FBPase 活性を示したことから超好熱始原菌においては IMPase が FBPase の役割を果たしていることが提案された。KOD1 株内にも IMPase 遺伝子が存在し、本遺伝子の組換え型タンパク質を解析したところ、本酵素 (Tk-imp) も *in vitro* で高い FBPase 活性を示した。そこで我々が開発した遺伝子破壊系を利用して、それぞれの遺伝子の欠損株を作製した ( $\Delta Tk-fbp$ ,  $\Delta Tk-imp$ )。2 種の欠損株をデンプンまたはピルビン酸を含む最少培地で培養したところ、デンプン存在下では双方の欠損株が宿主細胞と同等の生育を示したのに対して、ピルビン酸存在下では  $\Delta Tk-imp$  株は生育したが、 $\Delta Tk-fbp$  株は生育できないことが明らかとなった。**この結果より、*in vivo* で糖新生に関与する遺伝子は *Tk-fbp* 遺伝子であり、*Tk-imp* は *in vivo* では FBPase として機能していないことが判明した。**

#### 4) 個々の遺伝子産物の生化学的解析

我々は KOD1 株ゲノム上の様々な遺伝子を大腸菌内で発現し、それらの機能解析を行い、生理的役割を同定してきた。例えば、KOD1 株ゲノム上には一次構造からの annotation で phosphomannomutase であると推定される遺伝子が 4 個 (TK1108, TK1404, TK1777, TK2185) 存在する。それぞれを大腸菌内で発現し、組換え型タンパク質の精製・機能解析を行った。意外なことに TK1777 は phosphomannomutase 活性を示さず、phosphopentomutase 活性を示し、構造的に新規な phosphopentomutase であることが判明した。**これをきっかけに今まで超好熱菌では知られていなかった新しい代謝経路 (acetaldehyde + glyceraldehyde 3-phosphate → deoxyribose 5-phosphate → deoxyribose 1-phosphate → nucleoside) を発見することもできた。**さらに上記 4 種の相同遺伝子の内、TK1108 のみが実際に phosphomannomutase/phosphoglucomutase 活性を示すことも判明し、一次構造からの機能推定はあくまで一つの目安に過ぎないことを改めて実感した。残りの 2 種の遺伝子は phosphopentomutase/phospho-mannomutase/phosphoglucomutase いずれの活性も示さず、現在解析中である。

我々はさらに多数のタンパク質の結晶化・立体構造解析を進めており、上記の**新型 FBPase の他、hydrogenase 成熟化因子 HypA, HypC, HypD, HypE, 遺伝子組換えに関与する RecA タンパク質などの結晶化に成功している。**

**特記事項** (これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。)

Reverse gyrase は ATP 依存的に DNA の positive supercoiling を触媒する DNA topoisomerase の一種であり、多数の超好熱菌から同定・解析されている。超好熱菌 DNA の positive supercoil 構造は高温環境におけるゲノムの熱変性を防ぐために必要であると考えられている。Reverse gyrase は特徴的な構造を示し、N 末端領域は helicase-like domain、C 末端領域は topoisomerase IA domain からなる。これらの domain はそれぞれ全く別の protein superfamily (helicase superfamily 1/2、DNA topoisomerase Type IA family) に属する。したがって、reverse gyrase という酵素は helicase や DNA topoisomerase I などの酵素が進化した後に出現したことが示唆されている (図 1)。

また興味深いことに Database 検索の結果、全ての超好熱菌ゲノムに存在し、全ての常温菌ゲノムに存在しない ORF は reverse gyrase 遺伝子のみであることを見出した。これらの事実から reverse gyrase は超好熱菌の生育にとって必須であることが示唆され、その考えは定着している。上述の通り、reverse gyrase という酵素は

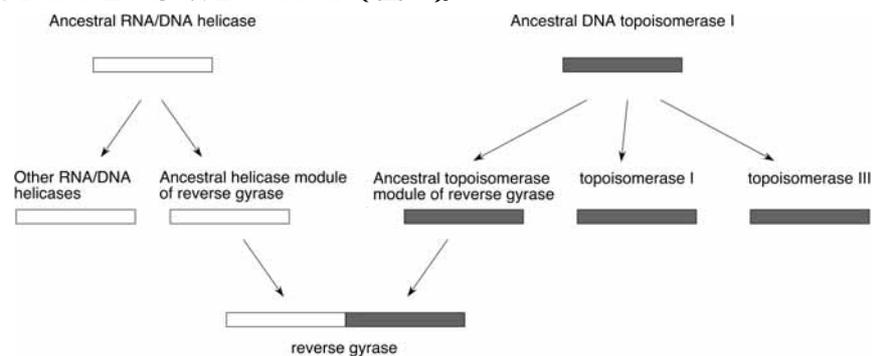


図 1. Reverse gyrase の分子進化

helicase や topoisomerase が進化した後に出現した酵素であるので、もし reverse gyrase が超好熱菌の生育にとって必須であるならば、最初の生命体が超好熱菌であったことはあり得ない。個々の helicase や topoisomerase の進化はより生育温度の低い生物内で進んだはずである。このような根拠から生命が超好熱菌として誕生した説は否定されている。

そこで、我々は reverse gyrase が超好熱菌の生育にとって必須であるかどうかを実験的に検証することにした。KOD1 株のゲノム解析の結果、reverse gyrase 遺伝子 (*Tk-rgy*) はゲノム上に唯一存在することが判明した。そこで KOD1 株の *trpE* 欠損株を宿主とし、*trpE* 遺伝子をマーカーとして *Tk-rgy* の破壊を試みた。この結果、致死的可能性が高いと考えられたが、tryptophan 非要求性の形質転換体が複数得られた。また PCR や Southern blot 解析により、*Tk-rgy* が破壊されていることが確かめられた。

そこで我々は破壊株 ( $\Delta rgy$  株) の phenotype を解析し、本酵素の生理的意義を実験的に検証することにした。宿主細胞が negatively supercoiled pBR322 に対して positive supercoiling 活性を有したのに対して (図 2)  $\Delta rgy$  株にはそのような活性は検出されなかった。様々な培養温度で  $\Delta rgy$  株と宿主の増殖特性を比較したところ、 $\Delta rgy$  株は全ての温度で宿主細胞よりも低い比増殖速度を示し、高温領域でその傾向が顕著となった。しかしながら、reverse gyrase 遺伝子の破壊は 90 °C において致死的是ではなかった。したがって、reverse gyrase 非存在下でも少なくとも 90 °C で生命は存在し得ることが分かった。

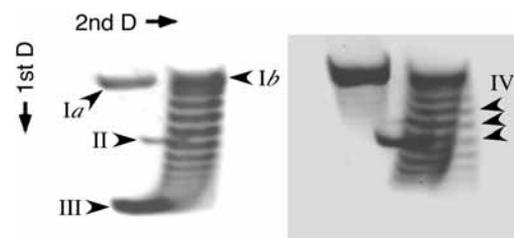


図 2. Reverse gyrase の positive supercoiling 活性。基質として pBR322 を用い、反応後 2 次元電気泳動を行った (反応の異なる段階を 2 つ示す)。Ia, nicked; Ib, relaxed; II, linear; III, negatively supercoiled; IV, positively supercoiled.

**Reverse gyrase の特徴的な構造と本酵素が超好熱菌の生育に必須であるという考え方から Hot origin of life (生命の起源=超好熱菌) が否定されていたが、本研究結果によりそれが可能であることが実験的に証明された。生命は reverse gyrase 無しで、少なくとも 90 °C 以上で誕生し得たことを示した。**

研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文 (発表予定のものを記入することも可能。) の全著者名、論文名、学協会誌名、巻 (号)、最初と最後のページ、発表年 (西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。)

#### 原著論文

1. Atomi, H., R. Matsumi, and T. Imanaka. Reverse gyrase is not a prerequisite for hyperthermophilic life. **J. Bacteriol.**: *in press* (2004).
2. Fukuda, W., T. Fukui, H. Atomi, and T. Imanaka. The first characterization of an archaeal GTP-dependent phosphoenolpyruvate carboxykinase from the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. **J. Bacteriol.**: *in press* (2004).
3. Rashid, N., H. Imanaka, T. Fukui, H. Atomi, and T. Imanaka. Presence of a novel phosphopentomutase and a 2-deoxyribose 5-phosphate aldolase reveals a metabolic link between pentoses and central carbon metabolism in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis*. **J. Bacteriol.**: *in press* (2004).
4. Atomi, H., T. Fukui, T. Kanai, M. Morikawa, and T. Imanaka. Description of *Thermococcus kodakaraensis* sp. nov., a well studied hyperthermophilic archaeon previously reported as *Pyrococcus* sp. KOD1. **Archaea**: *in press* (2004).
5. Shiraki, K., S. Nishikori, S. Fujiwara, T. Imanaka, and M. Takagi. Contribution of protein-surface ion pairs of a hyperthermophilic protein on thermal and thermodynamic stability. **J. Biosci. Bioeng.** 97: 75-77 (2004).
6. Amo, T., H. Atomi, and T. Imanaka. Biochemical properties and regulated gene expression of the superoxide dismutase from the facultatively aerobic hyperthermophile *Pyrobaculum calidifontis*. **J. Bacteriol.** 185: 6340-6347 (2003).
7. Higashibata, H., M. A. Siddiqui, M. Takagi, T. Imanaka, and S. Fujiwara. Surface histidine residue of archaeal histone affects DNA compaction and thermostability. **FEMS Microbiol. Lett.** 224: 17-22 (2003).
8. Kanai, T., S. Ito, and T. Imanaka. Characterization of a cytosolic NiFe-hydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. **J. Bacteriol.** 185: 1705-1711 (2003).
9. Kitabayashi, M., Y. Nishiya, M. Esaka, M. Itakura, and T. Imanaka. Gene cloning and function analysis of replication factor C from *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 67: 2373-2380 (2003).
10. Kudou, M., K. Shiraki, S. Fujiwara, T. Imanaka, and M. Takagi. Prevention of thermal inactivation and aggregation of lysozyme by polyamines. **Eur. J. Biochem.** 270: 4547-4554 (2003).
11. Sato, T., T. Fukui, H. Atomi, and T. Imanaka. Targeted gene disruption by homologous recombination in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. **J. Bacteriol.** 185: 210-220 (2003).
12. Shiraki, K., M. Tsuji, Y. Hashimoto, K. Fujimoto, S. Fujiwara, M. Takagi, and T. Imanaka. Genetic, enzymatic, and structural analyses of phenylalanyl-tRNA synthetase from *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. **J. Biochem. (Tokyo)** 134: 567-574 (2003).
13. Tanaka, T., T. Fukui, H. Atomi, and T. Imanaka. Characterization of an exo- $\beta$ -D-glucosaminidase involved in a novel chitinolytic pathway from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakamensis* KOD1. **J. Bacteriol.** 185: 5175-5181 (2003).
14. Amo, T., H. Atomi, and T. Imanaka. Unique presence of a manganese catalase in a hyperthermophilic archaeon, *Pyrobaculum calidifontis* VA1. **J. Bacteriol.** 184: 3305-3312 (2002).
15. Amo, T., M. L. F. Paje, A. Inagaki, S. Ezaki, H. Atomi, and T. Imanaka. *Pyrobaculum calidifontis* sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeon that grows under atmospheric air. **Archaea** 1: 113-121 (2002).
16. Fukui, T., T. Eguchi, H. Atomi, and T. Imanaka. A membrane-bound archaeal Lon protease displays ATP-independent proteolytic activity towards unfolded proteins and ATP-dependent activity for folded proteins. **J. Bacteriol.** 184: 3689-3698 (2002).
17. Hagihara, Y., K. Shiraki, T. Nakamura, K. Uegaki, M. Takagi, T. Imanaka, and N. Yumoto. Screening for stable mutants with amino acid pairs substituted for the disulfide bond between residues 14 and 38 of bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI). **J. Biol. Chem.** 277: 51043-51048 (2002).

18. Jeon, S. J., S. Fujiwara, M. Takagi, T. Tanaka, and T. Imanaka. *Tk*-PTP, protein tyrosine/serine phosphatase from hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1: enzymatic characteristics and identification of its substrate proteins. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 295: 508-514 (2002).
19. Maeda, N., T. Kanai, H. Atomi, and T. Imanaka. The unique pentaugonal structure of an archaeal Rubisco is essential for its high thermostability. **J. Biol. Chem.** 277: 31656-31662 (2002).
20. Hotta, Y., S. Ezaki, H. Atomi, and T. Imanaka. Extremely stable and versatile carboxylesterase from a hyperthermophilic archaeon. **Appl. Environ. Microbiol.** 68: 3925-3931 (2002).
21. Imanaka, H., T. Fukui, H. Atomi, and T. Imanaka. Gene cloning and characterization of fructose-1,6-bisphosphate aldolase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. **J. Biosci. Bioeng.** 94: 237-243 (2002).
22. Kitabayashi, M., Y. Nishiya, M. Esaka, M. Itakura, and T. Imanaka. Gene cloning and polymerase chain reaction with proliferating cell nuclear antigen from *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 66: 2194-2200 (2002).
23. Nakatani, M., S. Ezaki, H. Atomi, and T. Imanaka. Substrate recognition and fidelity of strand joining by an archaeal DNA ligase. **Eur. J. Biochem.** 269: 650-656 (2002).
24. Rashid, N., J. Cornista, S. Ezaki, T. Fukui, H. Atomi, and T. Imanaka. Characterization of an archaeal cyclodextrin glucanotransferase with a novel C-terminal domain. **J. Bacteriol.** 184: 777-784 (2002).
25. Shiraki, K., M. Kudou, S. Fujiwara, T. Imanaka, and M. Takagi. Biophysical effect of amino acids on the prevention of protein aggregation. **J. Biochem.** 132: 591-595 (2002).
26. Rashid, N., H. Imanaka, T. Kanai, T. Fukui, H. Atomi, and T. Imanaka. A novel candidate for the true fructose-1,6-bisphosphatase in Archaea. **J. Biol. Chem.** 277: 30649-30655 (2002).

#### 総説

27. 今中忠行、「地球環境とバイオテクノロジー」環境修復と有用物質生産～環境問題へのバイオテクノロジーの利用～、シーエムシー、1-2、2003.
28. 跡見晴幸、「極限環境微生物の特殊能力とその利用」環境修復と有用物質生産～環境問題へのバイオテクノロジーの利用～、シーエムシー、16-25、2003.
29. 跡見晴幸、福居俊昭、今中忠行、「超好熱菌の遺伝子操作」バイオサイエンスとインダストリー、61巻、7号、23-26、2003.
30. 今中忠行、跡見晴幸、「極限環境微生物の産業利用への展開」微生物の取扱いと利用・応用技術、情報機構、第6節、199-212、2003.
31. 跡見晴幸、今中忠行、「超好熱菌の高温環境適応戦略」生化学、75巻、7号、561-575、2003.
32. 跡見晴幸、「構造的に新しい超好熱始原菌由来 Rubisco」酵素工学ニュース、第47号、9-14、2002.
33. 今中忠行、「極限環境微生物の探索と利用」生物工学会誌、第80巻、第1号、2-9、2002.
34. 白木賢太郎、高木昌宏、今中忠行、「超好熱菌由来タンパク質の準安定構造とネイティブ構造への転移—熱成熟とよばれる現象」生物物理、第42巻、第4号、185-188、2002.
35. T. Imanaka & H. Atomi, Thermostable Type III Rubisco from hyperthermophilic archaea. Chap. 7, in *Recent research developments in Biotechnology and Bioengineering, Special Issue: Biotechnology and Bioengineering of CO<sub>2</sub> fixation*, 2002.
36. T. Imanaka & H. Atomi, Catalyzing 'Hot' Reactions: Enzymes from Hyperthermophilic Archaea. *The Chemical Records*, 2, 149-163, 2002.
37. T. Imanaka & H. Atomi, Rational Design of Functional Proteins, Chap. 3, , in *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis: A Comprehensive Handbook, 2nd completely revised and enlarged Edition*. Ed. by Karlheinz Drauz, Herbert Waldmann, Wiley-VCH, 67-93, 2002.
38. 今中忠行、「地球環境とバイオテクノロジー特集」*BIOINDUSTRY*, 19巻、1号、5-6、2002.
39. 跡見晴幸、「極限環境微生物の特殊能力の利用」*BIOINDUSTRY*, 19巻、1号、18-27、2002.
40. 今中忠行、跡見晴幸、「非光合成微生物による CO<sub>2</sub> 固定系」*ECOINDUSTRY*, 7巻、1号、61-72、2002.
41. 跡見晴幸、福居俊昭、今中忠行、「Rubisco に依存しない炭酸固定系～緑色硫黄細菌の炭酸固定系～」*バイオサイエンス&インダストリー*、60巻、1号、23-26、2002.
42. 今中忠行 監修、「微生物利用の大展開」エヌ・ティー・エス、2002.
43. 今中忠行、「地球の歴史と生命の進化」微生物利用の大展開、エヌ・ティー・エス、3-7、2002.

44. 江崎聡、「LCR 法—原理と方法論」微生物利用の大展開、エヌ・ティー・エス、501-506、2002.
45. 跡見晴幸、「炭酸固定経路」微生物利用の大展開、エヌ・ティー・エス、1066-1079、2002.
46. H. Atomi, Microbial enzymes involved in carbon dioxide fixation.. *J. Biosci. Bioeng.*, 94(6), 497-505, 2002.

基調講演・招待講演（国際学会）

1. T. Imanaka, Hydrogen production by the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis* KOD1, May 13 2003, Gratama Workshop 2003, Utrecht, the Netherlands.
2. T. Imanaka, Microbial enzymes involved in carbon dioxide fixation, Aug 25 2003, 11<sup>th</sup> European Congress on Biotechnology, Basel, Switzerland
3. T. Imanaka, Catalyzing Hot Reactions: Enzymes from Hyperthermophilic Archaea, Dec 16 2003, International Symposium on Bioprocess and Biomolecular Engineering, East China Univ. of Science & Technology, Shanghai, China
4. T. Imanaka, Rational Design of Functional Proteins, Dec 15 2003, Training Course on Biotechnology, East China Univ. of Science & Technology, Shanghai, China
5. T. Imanaka, Genomics and application of hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1, Nov 28 2003, FIRDI, Hsinchu, Taiwan
6. T. Imanaka, Microbial enzymes involved in carbon dioxide fixation, Nov 27 2003, FIRDI, Hsinchu, Taiwan
7. T. Imanaka, Isolation of extremophiles and adaptation strategy of hyperthermophiles toward hot environment, Nov 26 2003, BCRC, Hsinchu, Taiwan
8. T. Imanaka, Application of genomics in hyperthermophilic archaea, Sep 29 2003, IAB Meeting Marine Biotechnology Institute, Kamaishi, Japan
9. T. Imanaka, Hyperthermophiles and their thermostable enzymes, Feb 7 2003, BIOTECH-Thailand Science Park, Thailand
10. T. Imanaka, Evolution of PCR Enzyme, Dec 3 2002, IUPAC Polymer Conference 2002, Kyoto, Japan
11. T. Imanaka, Extremophiles: Hyperthermophiles, Nov 19 2002, UNESCO, Osaka Univ., Osaka, Japan
12. T. Imanaka, Excellent DNA polymerase from *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 for accurate, quick, and long PCR, Sep 24 2002, The 4<sup>th</sup> International Congress on Extremophiles, Naples, Italy
13. T. Imanaka, Evolution of PCR enzymes, Sep 16 2002, Finnish-Japanese Biotechnology Symposium, Turku, Finland
14. T. Imanaka, Evolution of PCR Enzymes, Jul 5 2002, 9<sup>th</sup> International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms, Gyeongju, Korea
15. T. Imanaka, Hyperthermophiles and their application, Cambodia-Japan Workshop "Tropical Bio-resources and Green chemistry strategy", Royal University of Phnom penh, Cambodia
16. T. Imanaka, Hyperthermophiles and their application, Jun 26 2002, Vietnam-Japan Workshop "Tropical Bio-resources and Green Chemistry Strategy", Nong Lam University, Ho Chi Minh, Vietnam
17. T. Imanaka, Hyperthermophiles and their application, Jun 24 2002, Vietnam-Japan Workshop "Tropical Bio-resources and Green Chemistry Strategy", Hotel Nikko, Hanoi, Vietnam
18. T. Imanaka, A novel type archaeal Rubisco with high activity for CO<sub>2</sub> fixation, Jun 11 2002, Sixth International Symposium on Environmental Biotechnology, Veracruz, Mexico.
19. T. Imanaka, Evolution of PCR enzymes, Aug 14 2002, Society for Industrial Microbiology 2002 Annual Meeting, Philadelphia, PA, USA.