

令和 6 年 9 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2019～2023

課題番号：19H05684

研究課題名（和文）ポストコッホ・アーキア学：第3の生命の姿

研究課題名（英文）Post-Koch studies on Archaea: the third domain of life

研究代表者

跡見 晴幸（Atomi, Haruyuki）

京都大学・工学研究科・教授

研究者番号：90243047

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 104,500,000円

研究成果の概要（和文）：新種の極限環境微生物を単離するとともに、アーキアを対象とし、arginine synthetaseなど新奇生物反応を触媒する酵素、dephospho-CoA kinase, lipoyl synthaseなど新奇構造を有する酵素、non-carboxylating pentose biphosphate pathway, arginine synthetase pathway, archaeal glycolate pathwayなど新しい代謝経路を解明した。これらの成果により、アーキアにおける代謝の理解に大きく貢献した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アーキアにおける代謝に関して、基盤代謝の多くの不明点を明らかにした。Archaeal glycolate pathwayの発見により、光呼吸経路など2-phosphoglycolateの解毒機構が酸素発生型光合成システムやCBB回路が進化する以前から出現していた可能性を示唆し、従来の認識を覆すものである。またarginine synthetaseはアーキアから同定できたが、その分布はバクテリアや真核生物に及び、生物のアミノ酸代謝の理解に大きく貢献するものである。

研究成果の概要（英文）：In addition to isolating novel extremophiles, we have identified enzymes from archaea that catalyze new biological reactions (e.g. arginine synthetase), display novel structures (e.g. dephospho-CoA kinase, lipoyl synthase) and new metabolic pathways (e.g. non-carboxylating pentose biphosphate pathway, arginine synthetase pathway, archaeal glycolate pathway). These findings have contributed greatly to our understanding of metabolism in archaea.

研究分野：極限環境微生物学

キーワード：微生物 アーキア 微生物分離 微生物機能 微生物ゲノム

## 1. 研究開始当初の背景

地球上の多様な生物からなる超地球生命体の特性を理解し、その持続的成長を維持するためには、そのコアをなす微生物の種と機能に裏付けされたポストコックホ機能生態系を理解することが重要である。アーキアはバクテリア（細菌）、ユーカリア（真核生物）とは系統学的に区別される第3の生物ドメインを構成する。アーキアは細菌と同様、核をもたない原核生物であるが、それが利用する生体分子の構造や代謝機構などは細菌のものと大きく異なる場合がある。細胞膜の膜脂質を例にとると、細菌・真核生物は直鎖状の脂肪酸がエステル結合を介してグリセロールと *sn*-1,2 の位置に結合しているものを利用するが、アーキアはイソプレノイド型の炭化水素鎖がエーテル結合を介して、かつ異なる立体化学 (*sn*-2,3 の位置) で結合している。代謝機構においても、アーキアには細菌・真核生物にはみられないものが数多く報告されている。メタン生成による異化代謝などはその代表例であるが、その他にペントース合成、ヌクレオシド分解、解糖・糖新生系、リポ酸生合成などに多くの特徴的な酵素や経路が利用されている。アーキアは培養種の数は少なく、その生命維持機構に関する研究は立ち遅れており、代謝やその制御などの生命機能を支持するメカニズムについて未だ不明な部分が多い。

## 2. 研究の目的

本計画研究では、アーキアの種と代謝機能の多様性を解明することを目的とし、主として以下の3つの研究課題に取り組む。(1) 本領域構成員が共有するモデル圃場やアーキアが生息すると考えられる多様な環境中から未培養系統群を含むアーキアの単離あるいは集積培養を進める。(2) 得られたアーキアを含む微生物(群)を対象に(メタ)ゲノム解析を行い、配列情報に基づいて個々のアーキアの代謝ポテンシャルを推定する。また培養実験と微量代謝解析技術を組み合わせることにより、代謝ポテンシャルを検証・評価し、各種代謝機能の有無を明らかにする。(3) アーキアの未同定代謝機能およびそれらを支える酵素・代謝経路とその制御機構を解明する。

## 3. 研究の方法

(1) モデル圃場や国内外のから多様な環境中から環境条件を参考に、または細菌や真核微生物の増殖を阻害する抗生物質を添加し、極限環境微生物やアーキアの濃縮・分離を試みた。生育し分離できたものについて、生化学的な特性を明らかにし、ゲノム解析等を進めた。(2) (メタ)ゲノム情報が得られているアーキアについて、代謝マップを作成し、中央代謝やアミノ酸生合成機構を推定した。代謝上の *missing link* について、主に生化学的な解析を通じて、対応する酵素の同定を試みた。(3) ゲノム情報を基盤とし、比較ゲノム解析によるターゲット遺伝子の推定、生化学的解析による翻訳産物の活性の同定、遺伝学的解析による機能の検証を進めた。

## 4. 研究成果

(1) モデル圃場、兵庫県武庫川温泉、有馬温泉、強酸性の水環境が複数点在する火山地帯である青森県恐山などから様々な温度、pH の水・泥試料を採取した。特に恐山は微生物の分離培養報告の少ない環境であり、ここからは温度 12-84°C、pH 1-6 の環境試料を採取した。28°C、pH 2.0 の条件では *Acidiphilium* 属・*Sulfobacillus* 属などに近縁な細菌、28°C、pH 5.2 では *Thiomonas* 属・*Acidiphilium* 属・*Metallibacterium* 属細菌および *Teratosphaeria* 属に近縁な真菌が分離できた。50°C、pH 2.0 では *Sulfobacillus* 属細菌が得られた。特に 28°C、pH 2.0 の条件で分離された MT-5 株は新種の可能性が高く、さらなる解析を進めた。MT-5 株は桿菌で、至適 pH 3.0、至適生育温度 30°C の好酸性細菌であり、アミノ酸や有機酸を炭素源として従属栄養生育を示した。ゲノム解析の結果、本菌ゲノムの大きさは 3.43 Mbp であり、3,217 の遺伝子が推定された。代謝ポテンシャルを検討した結果、解糖系の鍵酵素 phosphofructokinase の遺伝子がなく、糖新生や TCA 回路の酵素遺伝子が揃って確認され、本菌が糖類を利用しないことと合致した。一方で、MT-5 ゲノム上に Rubisco を含む Calvin-Benson-Bassham 回路のすべての酵素遺伝子が存在し、また本菌は元素硫黄の酸化をエネルギー源として独立栄養生育を示した。本菌を *Acidiphilium osorezanense* MT-5 株と命名した。本研究は A02-4 班との共同研究であった。この他、分担者を中心に、強酸性環境に生息する水素・硫黄酸化細菌に感染すると推測される全く新奇な RNA ウイルスゲノムを発見した。

(2) アスガルドアーキアは進化系統樹上で原核生物の中では真核生物の最も近くに位置づけられることや、真核生物特有とされてきたタンパク質を複数有することなどから研究対象として注目されているが、ほぼ全ての系統群が未培養な状況であり、現在も環境ゲノム解析に基づく新たな知見の蓄積が進んでいる。本研究においても、国際共同研究による真核生物の誕生や、アスガルドアーキア DNA ウイルスに関する新たな発見に貢献した。また 2020 年にアスガルドアーキア上門に属するロキアーキオータ門に分類される *Candidatus Prometheoarchaeum*

syntrophicum (Ps) がアスガードアーキアとしては初めて共集積培養され、完全長のゲノム情報が利用可能となった。共集積培養が可能となった一方で、生化学実験に必要な菌体量は得られないことから、我々は本菌のゲノム配列情報に基づいてその同化代謝ポテンシャルを推定した。その結果、本菌が培養実験からアミノ酸などの非糖質を基質とすることが示唆されているにもかかわらず、糖新生の鍵酵素である fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) のホモログ遺伝子を有しないことが明らかとなった。一方で、Ps ゲノム上には PPI-dependent 6-phosphofructokinase (PPI-PFK) ホモログ (Ps-pfk) が存在した。PPI-PFKはその逆反応、fructose 1,6-bisphosphate (FBP) と phosphate (Pi) から fructose 6-phosphate (F6P) と pyrophosphate (PPI) を生成する FBP:Pi phosphotransferase 反応も触媒し得ることから、FBPase の機能を果たす可能性を考えた。遺伝子合成、大腸菌における発現、組換え型タンパク質を精製し、その生化学的解析を進めたところ、本タンパク質が PPI-PFK 活性を示すことがわかった。また、Ps-Pfk が FBP から F6P を生成する逆反応を触媒できることも明らかとなった。この FBP の脱リン酸化は Pi へのリン酸基転移と共役しており、加水分解による脱リン酸化活性は検出されなかった。Phosphoenolpyruvate が PFK 反応およびその逆反応の両活性を大きく上昇させることを見出した。さらに、大腸菌において FBPase 遺伝子を欠失させた  $\Delta$ fbp 株の増殖相補実験を行い、糖新生条件下で Ps-Pfk は PPI-PFK の逆反応により大腸菌の FBPase を相補できることが示唆された。以上の結果から、Ps はいままでに知られている FBPase (Type I, II, III, V) とは異なる機構で糖新生を行っていることが示唆された。

今後上記のような代謝研究の結果を検証するためには微量の菌体量でメタボロームを解析する技術の開発が不可欠である。Microfluidic capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS) は高速且つ極めて正確に、アミノ酸分子内の安定同位体分子内標識を検出することが出来る。我々は新たなトレーサーを用いた代謝解析手法として ZipChip CE system と High-resolution Orbitrap Fusion MS を組み合わせることで、タンパク質由来のアミノ酸を対象とした場合、微生物細胞に換算して僅か  $10^4$ - $10^5$  細胞から十分な質のデータを取得することが可能であることを示した。本手法の有効性を確認するため、水素資化性メタン菌のモデル菌株として知られる *Methanothermobacter thermautotrophicus* 細胞由来の 16 種のアミノ酸を対象に解析を行い、いずれのアミノ酸も極めて高感度かつ高精度に測定可能であり、 $^{13}\text{C}$ - $\text{CO}_2$  で標識した細胞ではアミノ酸分子内の  $^{13}\text{C}$  標識位置の確定も可能であることを確認した。更に、serine、aspartate、glutamate の分子内標識を比較検討することにより、Wood-Ljungdahl 経路の他、不完全型還元系 TCA 回路による炭酸固定が起きていることを明らかにした。また、ゲノム情報と代謝経路データベースと分子内標識構造を比較検討することで、15 種のアミノ酸について、最も信頼しうる生合成経路を示すことに成功した。中でも、alanine、proline、threonine の生合成経路において、それぞれ 1 カ所の反応系における代替酵素の存在が明らかになった。本手法は現在知りうる限り最も簡便且つ高精度にアミノ酸生合成経路及び中央代謝経路を同定する手法であり、理論的には全ての単離微生物株への適用が可能である。微生物以外への適用も含め、今後の利用拡大が期待される (A01-5 内共同研究)。(メタ)ゲノム配列情報に基づいて興味深いアーキア種の代謝ポテンシャルを推定し、生化学的解析によりその検証を行った。また微量代謝解析技術を開発し、その有効性を実証した。

(3) ゲノム情報に基づいたアーキアの新規代謝酵素・経路については、主として超好熱性のアーキア *Thermococcus kodakarensis* と好塩性のアーキア *Halobacterium salinarum* を対象とした。

(i) *T. kodakarensis* においては、研究開始当初に今までに知られていなかったリポ酸の生合成経路を明らかにした。リポ酸は硫黄を含む脂肪酸であり、glycine cleavage system (GCS) や 2-oxoacid dehydrogenase の補酵素として機能する。GCS はグリシン由来の炭素をテトラヒドロ葉酸などの C1 キャリアーを介して他の化合物に供与することにより C1 代謝で機能している。リポ酸は GCS を構成するタンパク質の一つ H-protein のリポ酸結合ドメイン内のリジン残基とアミド結合しており、グリシン由来の炭素を受け取って C1 キャリアーへ受け渡している。例えば GCS から供給される炭素と水分子に由来するヒドロキシメチル基がグリシンに付加されてセリンを生成する。このように H-protein はリポ酸修飾 (リポイル化) されて機能を発揮できるようになる。大腸菌における H-protein のリポイル化機構では、まず脂肪酸生合成の代謝中間体 octanoyl-acyl carrier protein (octanoyl-ACP) からオクタノイル基が octanoyl transferase (LipB) によって H-protein 上に転移され、octanoyl-H-protein が生成する。次に lipoyl synthase (LipA) がオクタノイル基の C6 および C8 位に硫黄を挿入してリポイル化が完了する。また、lipoate-protein ligase (LplA) が遊離リポ酸を H-protein 上に転移してリポイル化する salvage 経路も存在する。一方、*T. kodakarensis* を含む多数のアーキアは H-protein を有するにもかかわらず LipB および LipA と有意な相同性を示すホモログをゲノム上に持っていない。その反面、salvage 経路で機能すると考えられる LplA のホモログは存在した。そこで、我々は *T. kodakarensis* における H-protein のリポイル化機構の解明を目指した。まず新規 lipoyl synthase の候補として、ゲノム解析で biotin synthase と名付けられた TK2109・TK2248 に着目した。好熱好酸性アーキア *Acidianus hospitalis* W1 のゲノムにおいてこれらのホモログの近傍に H-protein が存在したからである。また、biotin synthase が触媒する反応は dethiobiotin の炭素鎖への硫黄の挿入で、lipoyl synthase が触媒する反応と類似していた。遺伝子破壊実験と組換え型タンパク質の解析の結果、TK2109/TK2248 は既知の lipoyl synthase である LipA と

は1次構造が異なる新規な lipoyl synthase であることが同定でき、LipS と名付けた。さらに LplA ホモログの機能解明を目指した。TK1234 と TK1908 は各々が既知 lipoate-protein ligase (LplA) の N および C 末端側の領域と相同性を示した。これら 2 つの組換え型タンパク質を両方添加すると、リポ酸もしくはオクタン酸を基質にした際にペプチドへの ligase 活性を示すことが明らかになった。また、意外なことに salvage 経路のみで機能していると考えられていた LplA の遺伝子破壊株はセリン要求性を示し、オクタン酸を H-protein 上に結合する octanoate-protein ligase 活性により H-protein の de novo リポイル化機構にも寄与することが示唆された。(Appl. Environ. Microbiol., 2020, 2022)

(ii) 研究開始当初に我々は coenzyme A の生合成に関わる新規酵素 pantoate kinase (PoK) や新型の dephospho-CoA kinase (DPCK) を同定した。ゲノム配列から、両酵素はアーキアに広く存在し、細菌や真核生物に存在しないアーキア固有の酵素であることがわかった。本研究を通じてそれらの立体構造を明らかにした。また DPCK (TK1697 タンパク質) については部位特異的変異の導入による変異型タンパク質の解析も進めた。TK1697 ホモログ間で一次構造上高度に保存されている 8 残基 (Asp48, Asp67, Arg72, Asn90, Glu123, Glu124, Asp125, Tyr143) と、*T. kodakarensis* 由来 DPCK の結晶構造解析からその重要性が示唆された 4 残基 (Tyr31, Glu52, Tyr66, His117) を対象にした。Tyr31 を Phe に、他の残基はすべて Ala に置換したような変異型タンパク質 12 種を調製し、WT とともにそれぞれを精製した。50°Cにおいて比活性を測定した結果、9 種の残基置換により活性の低下が認められた。中でも D48A, D67A, E123A, E124A, D125A について、比活性の大きな低下が観察され、DPCK 活性に重要であることが示された。Dephospho-CoA が結合した結晶構造が得られていないため、GTP の  $\gamma$  リン酸の位置から dephospho-CoA が入る結合ポケットが 2 つ予想された。まず 1 つ目のポケット (①) では、DPCK ホモログ間で広く保存されている Tyr143 が、もう一つのポケット (②) では保存されていない残基 Glu52, Tyr66, His117 の 3 つの残基が相互作用すると予想された。これら 2 つの結合ポケットの可能性を検討するために変異型タンパク質 Y143A と Y66A について速度論的解析を行った。Dephospho-CoA を基質とした速度論的解析では、いずれも Michaelis-Menten 式に従う曲線が示唆された。また  $K_m$  値から、Y143A の方が活性低下への影響が大きいことが確認された。変異型タンパク質 E52A, H117A の比活性が WT と同等であること、また、Glu52, Tyr66, His117 がアーキア型 DPCK に広く保存されていないことなどを考慮すると、現時点では dephospho-CoA がポケット①に結合すると考えている。(Proteins, 2020, 2024)

(iii) 代表的な炭酸固定システムである Calvin-Benson-Bassham (CBB) 回路の鍵酵素 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) は、carboxylase 反応の基質である  $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$  の代わりに  $\text{O}_2$  分子を用いることで、ribulose 1,5-bisphosphate を酸化・開裂させる oxygenase 活性も有する。CBB 回路を利用する独立栄養生物の多くは、Rubisco の oxygenase 活性によって生成する 2-phosphoglycolate (2-PG) の蓄積を防ぐ代謝経路を有している。Type III Rubisco を有する *T. kodakarensis* は  $\text{O}_2$  を利用できない絶対嫌気性菌であるが、微好気条件下においても生育することが知られており、本菌も 2-PG の蓄積を回避する何らかの代謝機構を有していると考えられる。しかし本菌のように Rubisco を利用するものの CBB 回路を持たない生物における 2-PG 除去機構は、これまでに報告例がなかった。*T. kodakarensis* において glycine を 3-PGA に変換する一連の酵素群が同定されている。したがって 2-PG を glycine に変換する機構が存在すれば、oxygenase 反応によって生じた 2-PG を回収・利用できる代謝経路が本菌においても存在することになる。本新学術研究では既知の光呼吸経路を参考に、*T. kodakarensis* において 2-PG phosphatase (PGP)、glycolate dehydrogenase (GLDH)、alanine:glyoxylate aminotransferase (AGAT) をそれぞれ配列データベースから探索し、各候補タンパク質を生化学的に解析した。PGP 候補の内、TK1734 タンパク質は 2-PG に対して選択的な脱リン酸化活性を示した一方、TK2301 タンパク質は幅広い基質に対して活性を示したため、TK1734 タンパク質が本菌における PGP であることが示唆された。GLDH 候補はいずれも glycolate に対して選択的ではなかったが、 $k_{cat}/K_m$  値は TK0683 タンパク質 ( $0.486 \text{ sec}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ ) が TK0551 タンパク質 ( $0.0156 \text{ sec}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ ) より 31.2 倍高く、TK0683 タンパク質が本菌における GLDH であることが示唆された。AGAT 候補 TK0186 タンパク質は幅広いアミノ酸にも活性を示した一方、TK1094 タンパク質は alanine および glutamate にのみ強い活性を示した。本菌はこれら複数の aminotransferase によって glyoxylate を glycine に変換できることがわかった。本研究により、本菌は光呼吸経路に類似した一連の酵素反応によって 2-PG を glycine に変換し得ることが示唆された。また *T. kodakarensis* を培養した培地上清から glycolate が検出されたことから、脱リン酸化後に少なくとも一部は細胞外に放出されていることがわかった。(PNAS, 2024)

(iv) 真核生物や細菌はペントースリン酸経路でヌクレオシドを代謝するが、多くのアーキアは本経路を持たない。上記の通り、これまでに超好熱性アーキアの一部は炭酸固定酵素 Rubisco を含む新規経路でヌクレオシドを分解することを明らかにしてきた。その経路では Rubisco の基質は ribose-1,5-bisphosphate isomerase (R15Pi) によって ribose 1,5-bisphosphate の異性化により生成する。一方、好塩性アーキアの一部はゲノム上に R15Pi をコードするホモログ遺伝子を有するにもかかわらず、Rubisco は持たない。また、その基質である ribose 1,5-bisphosphate を生成する代謝経路も不明であった。つまり R15Pi は代謝上で孤立しており、新規なヌクレオシド代謝系を構成している可能性を考えた。そこで我々は、Rubisco を持たない好塩性アーキアにおける孤立した R15Pi が構成すると思われるヌクレオシド代謝系の解明を目指

した。対象の好塩性アーキアのゲノム情報を解析し、代謝上で孤立している R15pi 遺伝子とオペロンを形成することが多い遺伝子をヌクレオシド代謝遺伝子候補とした。これらの組換え型タンパク質を解析し、guanosine phosphorylase と ATP-dependent ribose-1-phosphate kinase であることを明らかにした。これらの酵素と R15Pi により、guanosine から ribose 1,5-bisphosphate を経て ribulose 1,5-bisphosphate を生成し得る。さらに比較ゲノム解析により、孤立 R15Pi を有するアーキアに特異的に存在する遺伝子を探索し、ribulose 1,5-bisphosphate 代謝遺伝子候補として haloacid dehalogenase (HAD)-superfamily hydrolase および fuculose-1-phosphate aldolase と推定されていた遺伝子を見出した。これらの組換え型タンパク質を解析し、各々 ribulose-1,5-bisphosphate phosphatase および ribulose-1-phosphate aldolase であることを同定した。また glycol aldehyde reductase も同定でき、以上の結果から、好塩性アーキアにおいて guanosine を ribulose 1,5-bisphosphate を経て dihydroxyacetone phosphate および ethylene glycol に代謝する新規ヌクレオシド代謝系を同定できた。これにより、基幹的な生体分子である nucleoside の代謝は各生物間で多様であることが示された。

(*Comm. Biol.*, 2022)

(v) アーキアの細胞表層を構成するタンパク質や糖タンパク質の修飾様式などはまだ不明な点が多い。特にアーキアにおいては asparagine 側鎖に結合した翻訳語修飾糖鎖 (N-glycan) の存在は確認されているが、その詳細な分子構造などは解明されていない。そこで *T. kodakarensis* の N-glycan の単離および構造決定を進めた。1種について、糖鎖が高度に glycosyl 化された inositol にリン酸を介して 2 糖が連結した新規な構造を有していた。N-glycan における inositol の存在は、真核生物・細菌・アーキアを問わず、初めての例である。

(*Angew. Chem. Int. Ed.*, 2023)

(vi) *T. kodakarensis* の ornithine  $\omega$ -aminotransferase 遺伝子 TK2101 破壊株は proline 要求性を示すことから、*T. kodakarensis* は TK2101 タンパク質による ornithine のアミノ基転移、自発的な脱水環化、proline dehydrogenase による還元を経て proline を生合成していることが示唆されている。しかし、本菌における ornithine の由来は不明であった。Ornithine を供給し得る既知の代謝経路として、arginine を加水分解して citrulline に変換する arginine deiminase (ArcA)、citrulline を ornithine と carbamoyl phosphate へと加リン酸分解する ornithine transcarbamoylase (ArcB)、carbamoyl phosphate のリン酸を ADP へ転移して carbamate と ATP を生じる carbamate kinase (ArcC) の 3 酵素からなる arginine deiminase (ADI) 経路が挙げられる。*T. kodakarensis* は ArcA ホモログを持たない一方、ArcB ホモログ (TK0871) と ArcC ホモログ (TK2158) を有している。したがって、ArcA に代替する別の酵素によって arginine を citrulline に変換し、ADI 経路に類似した代謝によって arginine から proline を生合成している可能性がある。そこで本研究では ArcA に代わる酵素の探索を行った。ADI 経路を構成する遺伝子のアーキアにおける分布を検討したところ、*arcC* を持つ種において、機能未知とされていた TK2200 遺伝子のホモログが *arcA* と相補的な分布を示すことがわかった。この TK2200 を *arcE* と名付け、*arcA* に代替する機能を有する候補遺伝子として解析を進めた。*arcE* 遺伝子を大腸菌内で発現して得られた組換え型タンパク質は、arginine deiminase 活性を示さなかった。ArcE が触媒する反応を推定するために、AlphaFold による予測構造から Dali server で類似のタンパク質を検索したところ、P-loop NTPase superfamily に属するタンパク質と似た骨格であることが示唆された。様々な基質を検討した結果、本酵素は Mg<sup>2+</sup> の存在下で arginine、ADP、リン酸と citrulline、ATP、NH<sub>3</sub> を可逆的に変換するいままでに知られていない酵素反応を触媒することがわかった。そこで本酵素を arginine synthetase と名付けた。また Arginine synthetase の生理的役割を明らかにするべく、遺伝学的解析を行った。*T. kodakarensis* において ArcE による arginine 分解に依存して proline が生合成されている場合、*arcE* 破壊株では proline 要求性が観察されるはずである。この際、ArcE の反応より下流の代謝産物である citrulline や ornithine を添加すると、生育が回復すると予想される。アミノ酸合成培地で生育を測定したところ、宿主株 KU216 は proline 添加培地において 10 時間程度で最大濁度まで到達し、proline 非添加培地では 30 時間程度かけて最大濁度に到達した。また proline 非添加培地に citrulline/ornithine を加えると、より早く生育するようになったことから、本菌の proline 生合成は citrulline/ornithine を経由していることが示唆された。一方 *arcE* 破壊株は proline 添加培地で生育するが、proline 非添加培地で全く生育しなくなった。更に citrulline/ornithine の添加により、生育の部分的な回復が観察された。この結果により、proline 生合成が *arcE* による arginine 分解に依存していることがわかった。最後に、本酵素反応が細胞内においても可逆的に働かうのか検討した。宿主株、*arcE* 破壊株ともに arginine 要求性であるが、citrulline を添加すると *arcE* を持つ宿主株のみ arginine 要求性が解除されたことから、本菌は充分量の citrulline を自ら生合成することはできないものの、ArcE タンパク質自体は *in vivo* でも可逆的に機能し得ることが明らかとなった。(PNAS, 2024)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計19件（うち査読付論文 19件 / うち国際共著 7件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Jin Jian-qiang, Sato Takaaki, Hachisuka Shin-ichi, Atomi Haruyuki	4. 巻 88
2. 論文標題 A Lipoate-Protein Ligase Is Required for De Novo Lipoyl-Protein Biosynthesis in the Hyperthermophilic Archaeon Thermococcus kodakarensis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/aem.00644-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sato Takaaki, Utashima Sanae, Yoshii Yuta, Hirata Kosuke, Kanda Shuichiro, Onoda Yushi, Jin Jian-qiang, Xiao Suyi, Minami Ryoko, Fukushima Hikaru, Noguchi Ayako, Manabe Yoshiyuki, Fukase Koichi, Atomi Haruyuki	4. 巻 5
2. 論文標題 A non-carboxylating pentose bisphosphate pathway in halophilic archaea	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-04247-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Su Yu, Michimori Yuta, Atomi Haruyuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Biochemical and genetic examination of two aminotransferases from the hyperthermophilic archaeon Thermococcus kodakarensis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2023.1126218	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tashiro Ryo, Sato Takaaki, Atomi Haruyuki, Miki Kunio, Fujihashi Masahiro	4. 巻 16
2. 論文標題 Altering the Phosphorylation Position of Pyrophosphate-Dependent <i>myo</i> -Inositol-1-Kinase Based on Its Crystal Structure	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 794 ~ 799
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscchembio.0c00733	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mori Yasunobu, Kawamura Hiroki, Sato Takaaki, Fujita Takayuki, Nagata Ryuhei, Fujihashi Masahiro, Miki Kunio, Atomi Haruyuki	4. 巻 203
2. 論文標題 Identification and enzymatic analysis of an archaeal ATP-dependent serine kinase from the hyperthermophilic archaeon <i>Staphylothermus marinus</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bacteriology	6. 最初と最後の頁 e00025-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JB.00025-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiraoka Satoshi, Sumida Tomomi, Hirai Miho, Toyoda Atsushi, Kawagucci Shinsuke, Yokokawa Taichi, Nunoura Takuro	4. 巻 50
2. 論文標題 Diverse DNA modification in marine prokaryotic and viral communities	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 1531 ~ 1550
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkab1292	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Jin Jian-qiang, Hachisuka Shin-ichi, Sato Takaaki, Fujiwara Tsuyoshi, Atomi Haruyuki	4. 巻 86
2. 論文標題 A Structurally Novel Lipoyl Synthase in the Hyperthermophilic Archaeon <i>Thermococcus kodakarensis</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e01359-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AEM.01359-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Gabriel V Pereira, Ahmed M Abdel-Hamid, Soumajit Dutta, Corina N D'Alessandro-Gabazza, Daniel Wefers, Jacob A Farris, Shiv Bajaj, Zdzislaw Wawrzak, Haruyuki Atomi, Roderick I Mackie, Esteban C Gabazza, Diwakar Shukla, Nicole M Koropatkin, Isaac Cann	4. 巻 12
2. 論文標題 Degradation of complex arabinoxylans by human colonic Bacteroidetes.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 459
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-20737-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ren-Chao Zheng, Xia-Feng Lu, Hiroya Tomita, Shin-Ichi Hachisuka, Yu-Guo Zheng, Haruyuki Atomi	4. 巻 203
2. 論文標題 TK1211 Encodes an Amino Acid Racemase towards Leucine and Methionine in the Hyperthermophilic Archaeon <i>Thermococcus kodakarensis</i> .	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bacteriology	6. 最初と最後の頁 e00617-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JB.00617-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Jan-Robert Simons, Haruki Beppu, Tadayuki Imanaka, Tamotsu Kanai, Haruyuki Atomi	4. 巻 130
2. 論文標題 Effects of high-level expression of A1-ATPase on H2 production in <i>Thermococcus kodakarensis</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 149-158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2020.04.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Melina Kerou, Rafael I Ponce-Toledo, Rui Zhao, Sophie S Abby, Miho Hirai, Hidetaka Nomaki, Yoshihiro Takaki, Takuro Nunoura, Steffen L Jorgensen, Christa Schleper	4. 巻 Online Ahead of Print
2. 論文標題 Genomes of Thaumarchaeota from deep sea sediments reveal specific adaptations of three independently evolved lineages	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ISME Journal	6. 最初と最後の頁 OnLine
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41396-021-00962-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Sato T, Takada D, Itoh T, Ohkuma M, Atomi H	4. 巻 24
2. 論文標題 Integration of large heterologous DNA fragments into the genome of <i>Thermococcus kodakarensis</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Extremophiles	6. 最初と最後の頁 339-353
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00792-020-01159-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Cann I, Pereira GV, Abdel-Hamid AM, Kim H, Wefers D, Kayang BB, Kanai T, Sato T, Bernardi RC, Atomi H, Mackie RI	4. 巻 86
2. 論文標題 Thermophilic Degradation of Hemicellulose, a Critical Feedstock in the Production of Bioenergy and Other Value-Added Products	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e02296-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AEM.02296-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Michimori Yuta, Yokooji Yuusuke, Atomi Haruyuki	4. 巻 121
2. 論文標題 An energy-conserving reaction in amino acid metabolism catalyzed by arginine synthetase	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2401313121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2401313121	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Michimori Yuta, Izaki Rikihisa, Su Yu, Fukuyama Yuto, Shimamura Shigeru, Nishimura Karin, Miwa Yuya, Hamakita Sotaro, Shimosaka Takahiro, Makino Yuki, Takeno Ryo, Sato Takaaki, Beppu Haruki, Cann Isaac, Kanai Tamotsu, Nunoura Takuro, Atomi Haruyuki	4. 巻 121
2. 論文標題 Removal of phosphoglycolate in hyperthermophilic archaea	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2311390121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2311390121	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Urayama Syun-ichi, Fukudome Akihito, Hirai Miho, Okumura Tomoyo, Nishimura Yosuke, Takaki Yoshihiro, Kurosawa Norio, Koonin Eugene V., Krupovic Mart, Nunoura Takuro	4. 巻 9
2. 論文標題 Double-stranded RNA sequencing reveals distinct riboviruses associated with thermoacidophilic bacteria from hot springs in Japan	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature Microbiology	6. 最初と最後の頁 514 ~ 523
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41564-023-01579-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Fukuyama Yuto, Shimamura Shigeru, Sakai Sanae, Michimori Yuta, Sumida Tomomi, Chikaraishi Yoshito, Atomi Haruyuki, Nunoura Takuro	4. 巻 4
2. 論文標題 Development of a rapid and highly accurate method for 13C tracer-based metabolomics and its application on a hydrogenotrophic methanogen	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 ISME Communications	6. 最初と最後の頁 ycad006
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ismeco/ycad006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kita Akiko, Ishida Yuna, Shimosaka Takahiro, Michimori Yuta, Makarova Kira, Koonin Eugene, Atomi Haruyuki, Miki Kunio	4. 巻 92
2. 論文標題 Crystal structure of <scp>GTP</scp> dependent dephospho coenzyme A kinase from the hyperthermophilic archaeon, <i>Thermococcus kodakarensis</i>	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics	6. 最初と最後の頁 768 ~ 775
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/prot.26666	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hirao Kohtarō, Speciale Immacolata, Notaro Anna, Manabe Yoshiyuki, Teramoto Yoshiaki, Sato Takaaki, Atomi Haruyuki, Molinaro Antonio, Ueda Yoshihiro, De Castro Cristina, Fukase Koichi	4. 巻 62
2. 論文標題 Structural Determination and Chemical Synthesis of the <i>N</i> Glycan from the Hyperthermophilic Archaeon <i>Thermococcus kodakarensis</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 e202218655
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202218655	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計30件（うち招待講演 19件 / うち国際学会 16件）

1. 発表者名 Haruyuki Atomi
2. 発表標題 Metabolism related to archaeal Rubiscos
3. 学会等名 EMBO workshop: Molecular Biology of Archaea 7 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Haruyuki Atomi
2. 発表標題 Metabolic roles of Rubiscos in Thermococcales
3. 学会等名 The 7th DSM 2022 International Workshop on Deep-Sea Microbiology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Haruyuki Atomi
2. 発表標題 The pentose bisphosphate pathway and related enzymes and pathways in archaea
3. 学会等名 13th International congress on Extremophiles (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Haruyuki Atomi
2. 発表標題 Identification of new enzymes and pathways in hyperthermophilic archaea
3. 学会等名 4th Sino-Japan Symposium on Biocatalysis and Biotransformation (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Haruyuki Atomi
2. 発表標題 The unique metabolism of hyperthermophilic Archaea: strategies for new enzyme discovery
3. 学会等名 1st International Conference on Bioengineering Technology Innovation (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Haruyuki Atomi
2. 発表標題 The unique metabolism of hyperthermophilic archaea
3. 学会等名 JpGU Meeting 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Haruyuki Atomi
2. 発表標題 The unique metabolism of hyperthermophilic archaea
3. 学会等名 The Philippine Society for Microbiology 50th Annual Convention and Scientific Meeting (PSM50) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Haruyuki Atomi
2. 発表標題 Structurally novel enzymes from hyperthermophilic archaea
3. 学会等名 2nd JSG Workshop on Biocatalysis and Bioprocess Development (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤喬章、牧野勇樹、森康暢、川村弘樹、蜂須賀真一、藤田嵩之、竹野領、永田隆平、藤橋雅宏、三木邦夫、今中忠行、跡見晴幸
2. 発表標題 超好熱性アーキアにおける serine kinaseの同定
3. 学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤喬章、森康暢、川村弘樹、藤田嵩之、永田隆平、藤橋雅宏、三木邦夫、跡見晴幸
2. 発表標題 超好熱性アーキアStaphylothermus marinus におけるATP-dependent serine kinase の同定
3. 学会等名 第73回 日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jian-Qiang Jin, Shin-ichi Hachisuka, Takaaki Sato, Tsuyoshi Fujiwara, Haruyuki Atomi
2. 発表標題 Identification of a structurally novel lipoyl synthase in the hyperthermophilic archaeon Thermococcus kodakarensis
3. 学会等名 第73回 日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Haruyuki Atomi
2. 発表標題 Metabolism involving Rubiscos in hyperthermophilic archaea
3. 学会等名 The 94th Annual Meeting of Japanese Biochemical Society (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀川拓、山本康之、Sung-Jae Lee、竹俣直道、金井保、跡見晴幸
2. 発表標題 超好熱性アーキアThermococcus kodakarensis におけるTrpY ホモログの機能解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊侑、宮本大暉、金井保、跡見晴幸
2. 発表標題 超好熱性アーキア <i>Pyrococcus chitonophagus</i> における新たなキチン資化経路の発見
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 道盛裕太、井崎力久、三輪有哉、濱北宗太郎、下坂天洋、牧野勇樹、竹野領、佐藤喬章、別府春樹、金井保、跡見晴幸
2. 発表標題 超好熱性アーキア <i>Thermococcus kodakarensis</i> における新規2-PG代謝経路の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤喬章、加地楓、跡見晴幸
2. 発表標題 腸内細菌における葉酸生成遺伝子の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Haruyuki Atomi
2. 発表標題 Unique metabolism in hyperthermophilic archaea
3. 学会等名 XVII Meeting of the Spanish Network of Extremophilic Microorganisms (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 跡見晴幸
2. 発表標題 超好熱性アーキアの特異な代謝
3. 学会等名 バイオインダストリー協会 発酵と代謝研究会 講演会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 跡見晴幸
2. 発表標題 Coenzyme biosynthesis in Archaea
3. 学会等名 43rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 友居昌慶, 加藤真悟, 伊藤隆, 平井美穂, 高木善弘, 布浦拓郎, 大熊盛也, 跡見晴幸
2. 発表標題 強酸性環境からの微生物の培養と分離
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 道盛裕太, 三輪有哉, 下坂天洋, 濱北宗太郎, 井崎力久, 跡見晴幸
2. 発表標題 超好熱性アーキアにおける原始的な光呼吸経路の同定
3. 学会等名 極限環境生物学会 第21回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 道盛裕太、三輪有哉、下坂天洋、濱北宗太郎、井崎力久、佐藤喬章、竹野領、牧野勇樹、跡見晴幸
2. 発表標題 アーキア型光呼吸経路の発見
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Haruyuki Atomi
2. 発表標題 The unique metabolism in Archaea
3. 学会等名 International Congress on Metabolic Sciences (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Haruyuki Atomi
2. 発表標題 Unique metabolism of the Archaea
3. 学会等名 10th International Symposium of Advanced Energy Science (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 跡見晴幸
2. 発表標題 アーキアにおけるCoA生合成経路
3. 学会等名 ビタミンB研究委員会第457回 研究協議会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Haruyuki Atomi
2. 発表標題 Elucidation of the entire CoA biosynthesis pathway in Archaea
3. 学会等名 1st Japan-Germany-Switzerland Workshop for Enzyme Technology and Bioprocess Development (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Haruyuki Atomi
2. 発表標題 Unique Carbon Metabolism in Archaea
3. 学会等名 50th Annual Meeting & International Symposium The Korean Society for Microbiology and Biotechnology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Haruyuki Atomi
2. 発表標題 Unique amino acid metabolism in hyperthermophilic archaea
3. 学会等名 3rd Japan-Switzerland-Germany Workshop on Biocatalysis and Bioprocess Development (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 跡見晴幸
2. 発表標題 超好熱性アーキアのC1代謝関連酵素超好熱性アーキアのC1代謝関連酵素
3. 学会等名 第75回日本生物工学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 跡見晴幸
2. 発表標題 アーキアにおける特異なアミノ酸代謝機構
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Atomi Lab website <a href="http://www.sbchem.kyoto-u.ac.jp/atomi-lab/en/">http://www.sbchem.kyoto-u.ac.jp/atomi-lab/en/</a> The Extremes of Life: Microbes and Their Diversity <a href="https://www.edx.org/course/the-extremes-of-life-microbes-and-their-diversity">https://www.edx.org/course/the-extremes-of-life-microbes-and-their-diversity</a>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	布浦 拓郎  (Nunoura Takuro)  (60359164)	国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋機能利用部門(生命理工学センター)・センター長代理    (82706)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
イタリア	University of Napoli			
米国	University of Illinois	NIH		
中国	Zhejiang University of Technology			