

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15166

研究課題名（和文）TCA回路の進化起源は炭酸固定代謝なのか、逆進化実験で解き明かす

研究課題名（英文）Ancestral enzyme reconstruction to identify the evolutionary origin of the TCA cycle to be a carbon fixation pathway.

研究代表者

亀谷 将史（Kameya, Masafumi）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・助教

研究者番号：80748517

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では還元的TCA回路中の3組6種の酵素に着目し、各組の祖先型酵素を構築した。祖先型酵素を大腸菌で異種発現させたところ、いずれの酵素種でも可溶性発現が見られた。得られた祖先型酵素は、rTCA回路における複数の反応の触媒活性を示し、これは「現存のTCA回路およびrTCA回路の進化起源は、より単純な酵素構成からなる原始的rTCA回路だった」という申請者の仮説を初めて実験的に支持する結果である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TCA回路（別名クエン酸回路、Krebs回路）は、多くの生物の炭素代謝・エネルギー代謝の中心で働き、もっともよく知られた代謝経路と言える。しかし、本代謝系がどのようにして成立したか、その進化的起源は明らかでなかった。本研究では、TCA回路を逆回しにした炭酸固定代謝（rTCA回路）に着目し、TCA回路がrTCA回路から進化したという説を提唱すると共に、単純な酵素構成の系からより複雑で高活性な系への代謝進化という新たなモデルが示された。

研究成果の概要（英文）：Protein sequences of three ancestral enzymes were deduced by using those of extant enzymes that catalyze two analogous reactions in the rTCA cycle. Genes encoding the ancestral enzymes were introduced to *Escherichia coli* and successfully expressed. The purified enzymes catalyzed the expected two reactions. This is the first experimental result that supports the author's hypothesis that the TCA cycle and the extant rTCA cycle evolved from a primitive rTCA cycle consisting of fewer number of enzymes.

研究分野：代謝進化学

キーワード：TCA回路 祖先型酵素 代謝進化 炭酸固定

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

TCA 回路 (別名クエン酸回路、Krebs 回路) は多くの生物の炭素代謝で中心的役割を果たす経路である。本経路は有機物を二酸化炭素へと酸化し、得られる還元力を電子伝達系へ流すことでエネルギー生産に寄与する。また、oxaloacetate や 2-oxoglutarate など、各種生合成系に不可欠な前駆体の供給も本回路の重要な役割である。こうした生物普遍的な重要性から、本回路はこれまでに最もよく研究された代謝系と言えるが、生物の進化過程で本回路がどのように成立したのか、その進化的起源については何ら示されていない。

二酸化炭素を唯一の炭素源とする独立栄養性生物の一部は、reductive TCA (rTCA) 回路と呼ばれる代謝を有する。rTCA 回路は「TCA 回路を逆回しにした経路」として一般的に知られ、二酸化炭素を取り込み有機物を合成する炭酸固定経路である。rTCA 回路の発見当初、本回路は「TCA 回路の単なる逆回し」あるいは「TCA 回路の特殊な派生形」と見なされてきた。しかし rTCA 回路の生化学的な解析の結果、rTCA 回路は炭酸固定方向に進むための独自の反応ステップや機構を有し、単なる TCA 回路の逆回しではないことが明らかとなった。

TCA 回路と rTCA 回路の進化系統関係は明らかにされていない。単純な反応ステップ数で言えば TCA 回路の方が少なく、より単純で古い経路とも考えられる。一方、rTCA 回路の方が古いという推測も一部で唱えられているが、ゲノム情報や生化学的実験に基づく検証はなされず、また具体的にどのような進化的過程を経てきたか論じられたこともない。

2. 研究の目的

研究代表者は「現存の TCA 回路および rTCA 回路の進化起源は、より単純な酵素構成からなる原始的 rTCA 回路だった」という仮説を提唱する。こうした進化仮説を実験的に検証することは通常困難であるが、本研究では逆進化実験により祖先型酵素を復元することでこの仮説を検証する。このように逆進化実験という新たな手法を用いることで、TCA および rTCA 回路の進化起源の解明と実験的再現という、挑戦的な課題の達成を目指す。

3. 研究の方法

原始生命が有していた祖先型酵素は現在地球上に存在しないが、その子孫である現存酵素配列を網羅的に解析することで祖先型酵素配列を復元する手法が近年確立されつつある。本研究ではその手法を用い、好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* の rTCA 回路に見られる相同酵素ペア 3 組について、祖先型酵素のアミノ酸配列を復元した。本手法では、現存生物の相同遺伝子配列をデータベースから収集し、最尤法に基づき系統解析することで、系統樹上の各進化段階で最も確からしいアミノ酸配列が推定された。

祖先型酵素をコードする DNA を人工合成し、大腸菌で異種発現・精製を行った。大腸菌の可溶性画分および不溶性画分の解析により、祖先型酵素が可溶性発現したか封入体を形成したかを判断した。異種発現の際には一部の遺伝子に His-tag を付与し、Ni カラムでの溶出パターンからサブユニット間相互作用の有無を判定した。

各祖先型酵素について、想定される反応の触媒活性を精製酵素を用いて測定した。これにより、構築した祖先型酵素が、現存酵素のように 1 種類の触媒活性しか有さないのか、あるいは仮説のように 2 種類の触媒活性を併せ持つのかを検証した。

4 . 研究成果

本研究では還元的 TCA 回路中の 3 組 6 種の酵素に着目し、各組の祖先型酵素を構築した。祖先型酵素を大腸菌で異種発現させたところ、いずれの酵素種でも可溶性発現が見られた。本研究で実験対象とした 3 組の酵素は、複数種のサブユニットがヘテロ複合体を形成するという点で、これまで祖先型酵素構築が行われた酵素の多くと異なる。本研究手法がヘテロ複合体を形成するタンパク質にも適用可能であることも示されたと言える。また、各種カラムクロマトグラフィーでヘテロ複合体は同一の画分に溶出したことから、還元された酵素でも安定なサブユニット間相互作用が維持されることが示された。得られた祖先型酵素は、rTCA 回路における複数の反応の触媒活性を示し、これは「現存の TCA 回路および rTCA 回路の進化起源は、より単純な酵素構成からなる原始的 rTCA 回路だった」という申請者の仮説を初めて実験的に支持する結果である。祖先型酵素の結晶構造解析や変異体解析などで、多機能型酵素から個別の高活性型酵素への進化過程という、これまで実験室で再現されたことのない酵素進化の理解につながることも期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masafumi Kameya
2. 発表標題 Restoration of the ancestral reductive TCA cycle as a primitive carbon fixation pathway.
3. 学会等名 The 5th ELSI International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 亀谷将史
2. 発表標題 炭酸固定代謝から見るTCA回路の進化的起源
3. 学会等名 平成29年度農学生命科学研究科研究交流会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masafumi Kameya
2. 発表標題 Multifunctionality at the root of carbon fixation and reconstruction of the ancestral state
3. 学会等名 ELSI 6th International Symposium (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 亀谷将史, 新井博之, 石井正治
2. 発表標題 水素細菌の代謝特性と低炭素社会実現に向けての展開
3. 学会等名 極限環境生物学会第20回シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 亀谷将史
2. 発表標題 中央代謝系から見えてくる微生物多様性と代謝進化
3. 学会等名 農学生命科学研究科2019研究交流会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----