

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15745

研究課題名（和文）独立栄養性細菌の新規アミノ酸合成経路探索を通じた炭酸固定代謝の理解

研究課題名（英文）Understanding carbonate fixation metabolisms by revealing novel amino acid biosynthetic pathways in autotrophic bacteria

研究代表者

千葉 洋子 (Chiba, Yoko)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・上級研究員

研究者番号：70638981

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、どのような経路でCO₂を固定し、生命にとって必須の細胞構成成分であるアミノ酸を生合成しているか不明なある細菌のCO₂固定経路およびアミノ酸合成経路を、多角的な実験により明らかにしました。本細菌は深海熱水孔に存在し、高温環境で水素とCO₂を食べて増殖します。このような特殊な環境に生息する生物の代謝を理解することは、生命の起源を理解することにつながります。

研究成果の学術的意義や社会的意義

初期生命がどのような生き物で、どのような進化を経て現在のような多様な生物になったのかを理解する上で、代謝進化を理解することが重要です。そのためには、現存するCO₂固定経路およびアミノ酸をはじめとする細胞構成成分の生合成経路にはどのような多様性があるのか、その多様性はどのような理由により生じたのか理解する必要があります。現在の状況を正確に理解することで、過去を合理的に推定することができるようになるからです。

研究成果の概要（英文）：In this study, multifaceted experiments were conducted to elucidate the CO₂ fixation and amino acids biosynthetic pathways of a bacterium, because amino acids are essential cellular components for life but the synthetic pathways of the bacterium from CO₂ had been unknown. This bacterium exists in deep-sea hydrothermal vents and thrives in high-temperature environments, feeding on hydrogen and CO₂. Understanding the metabolism of organisms living in such a unique environment will lead to an understanding of the origin of life.

研究分野：代謝生化学

キーワード：アミノ酸合成 代謝

1. 研究開始当初の背景

最初の生命が独立栄養生物だったのか、従属栄養生物であったのか、それとも混合栄養生物であったのかについては活発な議論が続いており、今のところ明確な解はない。しかし持続的な生命圏の確立に、独立栄養生物の誕生が必須であったことは明白である。すなわち、初期の生物がどのような代謝経路で CO₂ を固定し、アミノ酸をはじめとする細胞構成成分を生合成していたのかを知ることは、初期の生命進化を考える上で最も重要なポイントの一つである。しかし、我々は現存生物のそれすら十分に理解できていない。そこで現存生物の代謝の共通点・相違点を比較し、過去の姿を探るためには、現存生物の有する根源的であるにもかかわらず見過ごされてきた代謝経路を明らかにする必要がある。

研究開始当時、CO₂ を直接グリシン、さらにセリンとして同化する還元的グリシン経路を「第7の炭酸固定経路」として使用している微生物の存在が示唆されていた。すなわち、グリシン・セリンというアミノ酸の生合成経路の解明が CO₂ 固定経路進化を理解する上で重要であると期待された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、好熱性細菌 *Thermodesulfatator indicus* のグリシン・セリン生合成経路を明らかにすることである。本菌を研究対象に選んだ理由は以下の2点である。1点目は、本菌は独立栄養性細菌であるにもかかわらず、ゲノム上に既知のグリシン・セリン生合成遺伝子を欠くという点である。これは新規な経路もしくは酵素を用いてこれらアミノ酸を生合成していることを意味する。2点目は本菌の系統的特殊性である。本菌はゲノム情報から Wood-Ljungdahl 経路で炭酸を固定していると推定される。一方で研究開始当時の分類によると、本菌の近縁種は還元的 TCA (rTCA) 回路を用いているものであった。したがって *T. indicus* のグリシン・セリン生合成経路を明らかにし、炭酸固定経路と絡めて近縁種のそれと比較することで、独立栄養性生物の初期の姿および進化について新たな知見が得られるのではないかと考えた。

3. 研究の方法

T. indicus は大量培養が難しく、最終菌密度が低いことから一般的なメタボローム解析が困難である。また増殖能が低いことから、菌体破砕物からタンパク質を精製するのは現実的ではない。加えて、本菌の遺伝子改変技術は確立されていない。以上の理由から、以下に示す方法で本菌のリシン・セリン生合成経路および酵素の解明を目指した。

まず、¹³C 安定同位体標識された物質を添加して *T. indicus* を培養し、得られた菌体のタンパク質中のアミノ酸を修飾したのちに質量分析に供する(部位特異的安定同位体プロービング)。本手法はタンパク質内に固定されたアミノ酸を検出するため感度が高く、どの炭素が ¹³C 標識されたか分かるため、添加物がアミノ酸に変換されるまでの代謝経路を予測することができる。これにより、グリシン・セリン生合成を予想することが可能となる。

次に、予想された生合成経路の酵素活性が細胞破砕液に存在するか確認する。予想された酵素活性が検出され、かつその反応を担う酵素遺伝子がゲノム上に存在しない場合は、新規酵素の関

与が期待されるので、以下の通り同定を試みる。すなわち、候補となる酵素遺伝子を大腸菌に発現させて部分精製し、得られたタンパク質が目的の活性を示すか否か確認する。

4. 研究成果

まず、部位特異的安定同位体プロービングにより *T. indicus* がどの CO₂ 固定経路を利用して いるか検証した。CO₂、および Wood-Ljungdahl (WL) 経路の中間体である CO およびギ酸のラベル パターンから、本菌はゲノムから推定される通り WL 経路を用いていることが示された。本成果 は、好熱性細菌が WL 経路を CO₂ 固定経路として用いていることを実験的に示した初めての例で ある。

次に、グリシン・セリンのラベルパターンを精査したところ、本菌は還元的グリシン経路およ びそれに続く非リン酸化経路ではなく、糖新生系の中間産物を出発物質とするリン酸化経路を 用いてセリンを生合成し、セリンからグリシンを作っていることが強く示唆された。しかし、本 菌はリン酸化経路の最終反応を担う酵素 phosphoserine phosphatase (PSP) の遺伝子を欠く。そ こで、本当に推定されるリン酸化経路が機能しているのか確認するために、本菌の細胞破砕液を 用いて活性測定を行ったところ、PSP 活性が検出された。この PSP 活性は、既知の PSP には不要 な補酵素依存性を示したことから、*T. indicus* は既知の PSP とは相同性のない新規 PSP を有し ていることが強く示唆された。

さらに本新規 PSP を同定するために、比較ゲノム解析を駆使して 10 ほどに候補遺伝子を絞り 込み、これら遺伝子を大腸菌発現・部分精製して活性測定を行った。しかし期待された PSP 活性 は認められなかったため、今のところ本菌の PSP 遺伝子は不明である。現在、本菌体から PSP を 精製して同定するために、菌体の大量培養を試みているところである。

以下、CO₂ 固定経路の進化について考察する。研究開始当時、*T. indicus* は Aquificota 門の 近縁であるとされていたが、その後系統分類の再検討が行われ、*T. indicus* は Aquificota 門と は遠縁の Desulfobacterota 門に分類された。さらに、Desulfobacterota 門の一部の生物が還元 的グリシン経路を用いて CO₂ 固定を行っていること、Firmicutes 門のある生物が WL 経路と還 元的グリシン経路を共存させ、CO₂ から直接グリシン・セリンを生合成していることが報告 された。これら報告と我々の成果、すなわち *T. indicus* が WL 経路を有するが還元的グリシ ン経路は有さず、リン酸化経路でセリン、それに続くグリシンを生合成していることを合わせると、 次のことが言える。それは、CO₂ 固定とグリシン・セリン生合成には密接な関係があることは 強化されたものの、「CO₂ 固定経路として X を選べばグリシン・セリン生合成経路は Y に定ま る」といった単純なものではないということである。今後、CO₂ 固定経路とグリシン・セリン生 合成経路の関係をより詳細に検討する必要がある。

現存する 7 種類の CO₂ 固定経路の中で、WL 経路と rTCA 回路、もしくはこの 2 経路が共存する 経路が最も古い起源を有すると言われている。一方で、この 2 経路が共存する場合、両代謝は acetyl-CoA でつながるため、それぞれの代謝経路への acetyl-CoA の influx が増加する。WL 経 路と rTCA 回路は基本的に可逆な代謝系であるため、acetyl-CoA の influx が増加すると脱炭酸 方向の反応が好まれるようになる、すなわち CO₂ 固定経路として機能しなくなる恐れがある。そ こで、WL 経路を用いて CO₂ を固定する *T. indicus* と rTCA 回路を用いて CO₂ を固定するモデル生 物 *Hydrogenobacter thermophilus* に酢酸を加え、acetyl-CoA の influx を人為的に増加させた 条件で WL 経路と rTCA 回路が CO₂ 固定方向に機能可能か検証した。その結果、*H. thermophilus* の rTCA 回路は酢酸を同化しつつ CO₂ 固定方向に機能し続ける (acetyl-CoA の influx が rTCA 回 路にネガティブな影響を与えない) 一方で、*T. indicus* の WL 経路由来の acetyl-CoA の influx は酢酸由来のそれに比べて相当量抑制されることが示された。これはすなわち、WL 経路と rTCA

回路が共存した場合、WL 経路が CO₂ 固定方向に機能するメリットがないことを示唆する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 千葉洋子	4. 巻 59
2. 論文標題 アミノ酸生合成とCO2固定経路の密接な関係 グリーンバイオケミストリーから生命進化まで	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 458-463
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1271/kagakutoseibutsu.59.458	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 千葉洋子
2. 発表標題 分子内安定同位体プローピングを用いた好熱性独立栄養性細菌の炭酸固定経路の検証
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoko Chiba, Tomomi Sumida, Masafumi Kameya, Yoshito Chikaraishi, Takuro Nunoura
2. 発表標題 Visualization of CO2 Fixation Pathways in Thermophilic Bacteria
3. 学会等名 RIKEN BDR symposium 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoko Chiba, Tomomi Sumida, Masafumi Kameya, Yoshito Chikaraishi, Takuro Nunoura
2. 発表標題 Visualization of CO2 Fixation Pathways in Thermophilic Bacteria
3. 学会等名 2022 Molecular Basis of Microbial One-Carbon Metabolism Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

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