

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：82706

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H00988

研究課題名(和文) TCA回路の多様性とその起源の解明

研究課題名(英文) Diversity and origin of the TCA cycles

研究代表者

布浦 拓郎 (Nunoura, Takuro)

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

研究者番号：60359164

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題においては、様々な(超)好熱アーキア、バクテリアにおいてゲノム情報からその存在が推測される不完全型のTCA回路(クエン酸回路)の機能を明らかにするため、安定同位体トレーサーを用いたメタボローム解析を中心とするマルチオミクス解析を実施した。また、本研究の過程において、キャピラリー電気泳動とOrbitrap Fusion Mass Spectrometerを組み合わせる(CE-Orbitrap Fusion MS法)ことにより、従来の手法より格段に少量の試料で、高精度なデータ取得が可能なアミノ酸を対象とする新たな代謝解析手法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において確立したCE-Orbitrap Fusion MSによる代謝解析手法は、理論的にあらゆる単離微生物に対して僅か試験管1本で中央代謝経路及びアミノ酸産生合成経路を検証することを可能とする。つまり、本技術は、新規代謝経路の探索を容易とするだけでなく、ポストゲノム情報に不可欠な代謝マップ等の精度の向上に大きく貢献するポテンシャルを有することを意味する。また、この技術を用いることにより、従属栄養性の超好熱バクテリア等におけるCO<sub>2</sub>固定能が従来の想定より相当程度大きいことを明らかにした。今後、これらの知見は微生物を用いる物質生産システムの構築にも貢献するであろう。

研究成果の概要(英文)：In order to understand the function of the putatively incomplete TCA cycle (citric acid cycle) in (hyper)thermophilic archaea and bacteria, we conducted multi-omics analyses including tracer-based metabolomics using stable isotope tracers. Moreover, we have developed a novel tracer-based method of metabolomics for amino acids in combination with capillary electrophoresis and Orbitrap Fusion Mass Spectrometry (CE-Orbitrap Fusion MS). The novel method has advantages in data quality and sample preparation; only 1x10<sup>5</sup> cells are required, comparing to the methods for the tracer-based metabolomics.

研究分野：微生物学

キーワード：クエン酸回路 TCA回路 メタボローム 好熱菌 アーキア 炭酸固定 CO<sub>2</sub>固定

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

ほぼ全ての生物学・生化学の教科書には、TCA 回路は“ エネルギー生産の根幹を支える仕組み ”として描かれる。それは、酸化方向(つまり時計回り)に機能して、脱炭酸しつつ電子伝達系でのエネルギー生産に利用される NAD(P)H を生産する回路であり、主に好気性生物に分布する。また、TCA 回路の中間代謝産物である個々の有機酸や acetyl-CoA は、アミノ酸や脂質、核酸、糖等の生合成経路の起点となる。酸化的 TCA 回路に対しては詳細な生化学研究や、モデル生物を利用した遺伝子破壊実験等による研究が蓄積し、この回路は最も良く理解された代謝系路の一つであることは間違いない。その一方、還元的に(反時計回りに)機能することで炭酸固定を行う還元的 TCA 回路の存在も古くから知られる。加えて、近年のゲノム情報に基づく研究から、未だに下に列挙するように TCA 回路の多様性に関する新たな知見が続けて報告されている。即ち、TCA 回路は、非常に古典的かつ新しい研究対象なのである。

- (1) 殆どの反応において同一の反応を担う酵素遺伝子に起源や補因子等の異なる複数の型が存在する。
- (2) よく知られるグリオキシル酸経路のようなバイパスが複数存在し、近年も新たな経路が報告されている(例えば Kwong et al. 2017 in Nat Microbiol)。
- (3) ゲノム解析から、回路の一部を担う既知酵素が欠ける多様な不完全な回路の存在が示唆されている。
- (4) 完全型にも、反時計回りに機能し炭酸固定を行う還元型、更に中央代謝経路がピルビン酸やホスホエノルピルビン酸で分岐し、分岐後、時計回りと反時計回りで機能する分岐型が知られている。更に 2018 年には、基質として添加した基質の種により回転方向が変化する可逆型の存在が報告された (Nunoura et al. 2018 in Science, Mall et al. 2018 in Science)。

なかでも、研究代表者らが発見した可逆的 TCA 回路の可逆性は、酸化的 TCA 回路で機能する citrate synthase が、常識に反し、逆反応であるクエン酸開裂反応([クエン酸+CoA] - [オキサロ酢酸 + acetyl-CoA]: 吸エルゴン反応である!)にも機能することで担保される。このような TCA 回路の多様性は、高い保存性と一見相反する可塑性があること、普遍的な役割は、エネルギー生産よりも、アミノ酸や脂質、核酸、糖等の生合成経路の起点となる中間代謝物の生合成にあることを示唆する。そして、この点において、TCA 回路は生命誕生時の代謝を理解するに不可欠であると認識されている(Braakman & Smith 2012 等)。中でも、炭酸固定に貢献する還元的 TCA 回路は、最古の炭素固定経路の一つではないかと考えられてきた。なお、最古の炭素固定経路と考えられているもう一つの経路は、メタン生成アーキアや酢酸生成バクテリア等有し、二酸化炭素や一酸化炭素からアセチル CoA を生産する Wood-Ljungdahl 経路(WL 経路: 還元的アセチル CoA 経路)である (Braakman & Smith 2012 等) (図 2)。実際、近年の化学者による実証的な生命の起源研究において、化学進化の時代に遡る非生物学的な TCA 回路の成立に関する成果が盛んに報告されている(例: Keller et al. 2017, Muchowska et al. 2017 いずれも Nat Ecol Evol)。なお、研究代表者らが見いだした可逆的 TCA 回路では、上述の通り、citrate synthase を含む全く同じ酵素セットが、回転方向が変化しても使われる。この現象は TCA 回路が本質的に完全に可逆的であり、可逆的 TCA 回路により、生命は環境における有機物量の量に適応して独立栄養にも、従属栄養にも機能する混合栄養生物として誕生した可能性を示唆している(Nunoura et al. 2018, Mall et al. 2018 in Science)。

一方で、本研究計画の研究対象となるゲノム情報に基づく経路の推測から不完全であることが推測される TCA 経路については、多くの場合、ゲノム情報からの推察に留まり、欠損が推測される酵素反応に対応する未知代替酵素遺伝子が存在するのか、それを回避する未知のバイパス経路が存在するのか、あるいは実際に部分的に機能しているのか、更に、他の生合成経路との関係等について、ほとんど実験的・実証的な検討はされていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究においては、特に始原的系統群に属す好熱性アーキア、バクテリアを対象に、ゲノム情報から不完全であることが推測される“不完全型”TCA 回路の機能解明、そして、WL 経路と rTCA 回路の共存の可能性について、安定同位体トレーサー ( $^{13}\text{C}$  標識基質) を用いた代謝解析を中心とするマルチオミクス解析による解明を目指した。

上述の研究代表者らが明らかにした可逆的 TCA 回路は、TCA 回路が内包してきた性質を明示し、更に化学進化を含む生命誕生における TCA 回路の姿について新たな見方をもたらした。しかし、多くの微生物が有す“不完全型”TCA 回路の仕組み/役割や、TCA 回路と同様に始原的生命において存在した可能性の高い WL 経路と TCA 回路の関係は未だ謎に包まれている。更に、ゲノム解析から推測される“不完全型”TCA 回路にはいくつかのパターンが存在し、“不完全型”TCA 回路にもパターン毎に共通する仕組みの存在が推測される。また、WL 経路との

関係においては、従来、一つの生物が全く異なる複数の炭素固定系は持たないと考えられてきたが、近年、還元型 TCA 回路を有す始原的水素酸化バクテリアがほぼ完全な WL 経路を保持している可能性がゲノム解析から示されていた (Giovannelli et al. 2017)。WL 経路と TCA 回路はアセチル CoA で接続する。これまでに研究代表者らが明らかにした可逆的 TCA 回路においては、アセチル CoA のインプット量が、TCA 回路の向きを決定する重要な要素であることが示唆されており、WL 経路と TCA 回路の共存は、炭酸固定経路の進化という課題に留まらず、TCA 回路の回転方向の制御の仕組みを知る観点からも非常に面白い現象である。そこで、本研究では、主に始原的系統に属すアーキア、バクテリアにおける様々な不完全型 TCA 回路の仕組みを解明すると共に、特に TCA 回路と WL 経路の関係性について着目して検討を進めた。

### 3. 研究の方法

(1)Capillary Electrophoresis-Orbitrap Fusion Mass Spectrometer を用いた  $^{13}\text{C}$ -アミノ酸トレーサー代謝解析手法の開発

代表者らは可逆的 TCA 回路の発見にあたり、Gas Chromatography MS と解析ソフトウェア (MassWorks) を組み合わせた手法を採用することにより、培養条件に応じ、TCA 回路の反応方向が変化することを証明した。しかし、本研究の当初において、当該手法では、原因不明のバックグラウンドが解析精度の障害になりうること、また、所属機関が有す Orbitrap Fusion MS と Capillary Electrophoresis システムを通して試料を導入することにより、精密質量に基づくより精緻な解析系の構築が出来る可能性が浮上した。そこで、本研究の当初計画を変更し、新たな手法として Capillary Electrophoresis システム (Zip Chip) と Orbitrap Fusion MS を組み合わせた CE-Orbitrap MS によるアミノ酸解析手法の確立を目指すこととした。なお、GC-MS 法では、菌体を酸分解して得たアミノ酸を誘導体化する必要があるが、本手法においては、酸分解して得たアミノ酸あるいは、菌体から抽出した遊離アミノ酸を直接 CE へ導入することが可能である。また、本手法開発においては、WL 経路と不完全型 TCA 回路を有す *Methanothermobacter thermoautotrophicus* を試験菌として用いた。

(2)不完全型 TCA 回路の機能解析  
本研究では  $^{13}\text{C}$  安定同位体トレーサーを用いたメタボローム解析が中核技術となる。上述の技術開発と、不完全型 TCA 回路の機能解析を並行して実施した為、本研究前半では従来の GC-MS を、後半では CE-Orbitrap Fusion MS による解析をそれぞれ実施した。また、不完全型 TCA 回路には、図 1・2 に纏めたように類型が存在するが、本研究期間中、(超)好熱バクテリアでは、偏性従属栄養バクテリアである *Thermotoga*、化学合成独立栄養あるいは化学合成混合栄養条件で増殖する *Thermodesulfator* を、(超)好熱アーキアでは、上記の水素酸化メタン菌 *Methanothermobacter* の他、化学合成独立栄養あるいは化学合成従属栄養条件で増殖する *Archaeoglobus*、偏性従属栄養アーキアである *Thermococcus* を対象に、各種培養条件で培養し、それぞれにおける不完全型 TCA 回路解析を進めた。

### 4. 研究成果

(1)Capillary Electrophoresis-Orbitrap Fusion Mass Spectrometer を用いた  $^{13}\text{C}$ -アミノ酸トレーサー代謝解析手法の開発

本研究申請段階においては、GC-MS と解析ソフトウェア MassWorks の組み合わせにより、 $^{13}\text{C}$ -アミノ酸トレーサー代謝解析を実施することを想定していた。具体的には、 $^{13}\text{C}$  標識した基質を用いて培養した菌体を酸分解してタンパク質に固定されていたアミノ酸を抽出し、誘導体化後に GC-MS 解析、得たデータを MassWorks にて解析することで、各アミノ酸の分子内標識位置を確

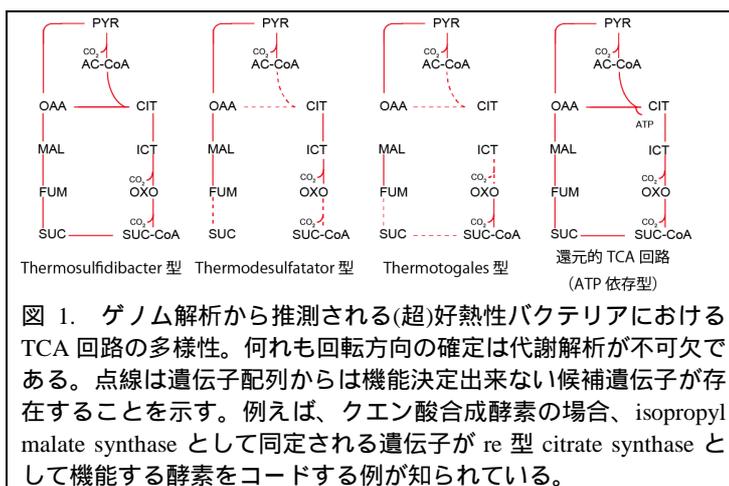


図 1. ゲノム解析から推測される(超)好熱性バクテリアにおける TCA 回路の多様性。何れも回転方向の確定は代謝解析が不可欠である。点線は遺伝子配列からは機能決定出来ない候補遺伝子が存在することを示す。例えば、クエン酸合成酵素の場合、isopropyl malate synthase として同定される遺伝子が re 型 citrate synthase として機能する酵素をコードする例が知られている。

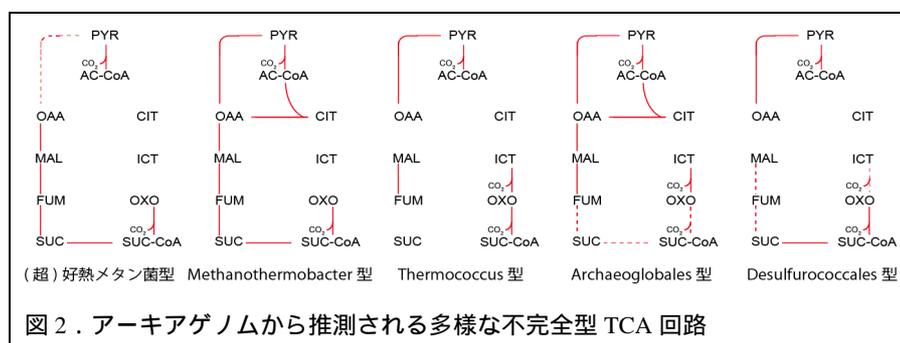


図 2. アーキアゲノムから推測される多様な不完全型 TCA 回路

定する、という手法である。更に、TCA 回路の中間代謝産物であるピルビン酸、オキサロ酢酸、オキソグルタル酸を前駆体とするアミノ酸の分子内標識の情報とゲノム情報等を組み合わせることで、TCA 回路の回転方向やそれぞれの有機酸等の由来を推測することが可能となる。

しかし、本研究の開始時点において、所属機関に設置されていたキャピラリー電気泳動と Orbitrap Fusion MS を組み合わせることで(CE-MS)、より高精度なデータを取得出来る可能性が浮上していた。そこで、本研究の当初段階においては、GC-MS による解析と CE-MS の両手法によりデータを取得し、それぞれの特性を把握し、より優れた手法を以降の解析に用いることと方針を変更した。その結果、GC-MS 法で用いる酸分解から誘導体化にかけての過程において、いくつかの技術的課題が明らかとなり、従来標準的に用いられてきた試料処理手法への改善を提案した他(澄田ら 2019) GC-MS の解析原理に伴う事象が、測定時のバックグラウンドに影響していることを見出した(Sumida et al. in preparation)。一方、CE-MS では、非常にバックグラウンドの低い高精度なデータが僅か数分で取得できること、固定されたアミノ酸だけでなく、細胞内の遊離アミノ酸の分析にも適用可能なこと、更に、固定アミノ酸を解析対象とする場合は、僅か原核生物で  $10^5$  細胞程度に相当する試料量で解析可能なことが明らかとなった(島村ら 2019; Fukuyama et al. in preparation)。このことは、あらゆる微生物単離株において、試験管一本の培養があれば、中央代謝及びアミノ酸合成経路を同定することが可能なメタボローム解析手段が生まれたことを意味する。その為、以降の解析は、この CE-MS による解析により、研究を進めることとした。

CE-MS の試行においては、WL 経路による炭酸固定とメタン生成を行う他、クエン酸-オキソグルタル酸の間を欠く不完全型 rTCA 回路による炭酸固定の可能性が議論されてきた *M. thermoautotrophicus* を試験菌として用いた。この試験解析においては、ゲノム情報より、それぞれピルビン酸、オキサロ酢酸、オキソグルタル酸の分子内構造を保存するアミノ酸としてセリン、アスパラギン酸、グルタミン酸を対象とした解析を行い、本菌が、WL 経路による炭酸固定を行っていること、更に不完全型 rTCA 回路による炭酸固定も行っていることと整合する解析結果を得た。これまで本菌が不完全な rTCA 回路により炭酸固定を行う可能性は様々な形で提唱されてきたが、信頼度の高いメタボローム解析によりそれを支持する結果が得られたのははじめてである。更に、本菌のゲノム情報と KEGG や MetaCyc 等の公共データベース、そして本解析による全アミノ酸の分子内構造を照合し、最も信頼にたる全アミノ酸の生合成経路を構築した他、アラニン、プロリン、トレオニンの 3 種のアミノ酸生合成経路において未知酵素が存在する可能性を呈示することが出来た(Fukuyama et al. in preparation 1)。

## (2)不完全型 TCA 回路の機能解析

・ *Thermodesulfatator* 型の不完全型 TCA 回路：化学合成独立栄養条件あるいは化学合成混合栄養条件で増殖する本菌の不完全型経路では、コハク酸と succinyl-CoA が連結しない。更に、ゲノム情報より、典型的な Si 型の citrate synthase が欠落し、その代替酵素として isopropyl malate synthase として同定される遺伝子が Re 型 citrate synthase として機能する可能性が示唆されていた。その他、コハク酸と succinyl-CoA 間の接続も、コハク酸と acetyl-CoA が CoA transferase に反応することにより担保される可能性も排除されない。*Thermodesulfatator indicus* を用いた試験を実施したところ、本菌においてはアナプロレティック経路が還元方向に機能する分岐型の TCA 回路が駆動していることが示された。この結果は、re 型 citrate synthase が機能していること、更に、コハク酸と succinyl-CoA の変換反応が存在しないことを意味している(Chiba et al. in preparation)。

・ *Thermotoga* 型の不完全型 TCA 回路：Thermotoga は嫌気条件下での従属栄養条件でのみ増殖する。また、本菌では高濃度 CO<sub>2</sub> を気相に添加すると、酢酸から乳酸を生産することが知られている。本研究での代謝解析の結果、実際に欠失しているのは、オキサロ酢酸とリンゴ酸、フマル酸とコハク酸の間の 2 カ所であることが明かとなり、また、アナプロレティック経路が還元方向に機能する分岐型の経路として機能していることが示された。なお、高 CO<sub>2</sub> 条件下では、acetyl-CoA ピルビン酸間の経路が還元方向に機能することも確認出来た(Fukuyama et al. in preparataion 2)。

・ アーキア型の不完全 TCA 回路：上述の *Methanothermobacter* の他、現在も、嫌気条件下での従属栄養条件でのみ増殖する *Thermococcus*、化学合成独立栄養あるいは混合栄養条件で増殖する *Archaeoglobus* を対象とした解析を進めている。予察的な結果であるが、*Thermococcus* ではゲノム情報から推察される欠失が実際に生じていることを強く示唆する結果を得ている。引き続き、解析を継続し、それぞれ論文に纏める予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 力石嘉人、滝沢侑子、布浦拓郎	4. 巻 79
2. 論文標題 安定同位体の天然存在量および安定同位体標識の検出法 - 2 : ガスクロマトグラフィー質量分析計と MassWorks	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 低温科学	6. 最初と最後の頁 23-29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14943/lowtemsci.79.23	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 島村繁、澄田智美、布浦拓郎	4. 巻 79
2. 論文標題 オービトラップ質量分析計を用いたアミノ酸解析の可能性	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 低温科学	6. 最初と最後の頁 37-42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14943/lowtemsci.79.37	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 澄田智美、島村繁、布浦拓郎	4. 巻 79
2. 論文標題 Orbitrap Fusionを用いたCE-MSと四重極GC-MSでのアミノ酸分析の比較	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 低温科学	6. 最初と最後の頁 43-49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14943/lowtemsci.79.43	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 3件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Yoko Chiba, Tomomi Sumida, Masafumi Kameya, Yoshito Chikaraishi, Takuro Nunoura
2. 発表標題 The rediscovery of obligately chemolithoautotrophs as chemolithomixotrophs provides insights into the ancestral carbon fixation metabolism
3. 学会等名 Gordon Research Conference: Molecular Basis of Microbial One-Carbon Metabolism (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takuro Nunoura
2. 発表標題 Variation of TCA cycle and Its Contribution of Carbon Fixation in (Hyper)thermophilic Archaea and Bacteria
3. 学会等名 Gordon Research Conference: Molecular Basis of Microbial One-Carbon Metabolism (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 千葉洋子, 澄田智美, 亀谷将史, 力石嘉人, 布浦拓郎
2. 発表標題 Visualization of CO2 Fixation Pathways in Thermophilic Bacteria
3. 学会等名 Emergence in Biological Systems: Challenges to Bridging Hierarchies (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福山宥斗, 澄田智美, 島村繁, 酒井早苗, 跡見晴幸, 布浦拓郎
2. 発表標題 微量メタボローム解析を用いたMethanothermobacter thermautotrophicusにおけるアミノ酸生合成系の再構築
3. 学会等名 第34回日本Archaea研究会講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福山 宥斗, 島村 繁, 澄田 智美, 力石 嘉人, 千葉 洋子, 跡見 晴幸, 布浦 拓郎
2. 発表標題 微量メタボローム解析による従属栄養性超好熱バクテリアThermotogaのCO2再利用能の評価
3. 学会等名 The 35th annual JSME conference
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuto Fukuyama, Tomomi Sumida, Shigeru Shimamura, Yoko Chiba, Hisato Chikaraishi, Haruyuki Atomi, Takuro Nunoura
2. 発表標題 Reassimilation of CO <sub>2</sub> and acetate in <i>Thermotoga maritima</i> revealed by <sup>13</sup> C isotope tracing experiments using microfluidic capillary electrophoresis-mass spectrometry
3. 学会等名 Gordon Research Conference: Molecular Basis of Microbial One-Carbon Metabolism (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 千葉 洋子、澄田 智美、力石 嘉人、布浦 拓郎
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 布浦拓郎
2. 発表標題 高濃度CO <sub>2</sub> と(超)好熱菌の中央代謝
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 布浦拓郎
2. 発表標題 中央代謝経路の可逆性と生命進化
3. 学会等名 日本遺伝学会第95回大会(招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	力石 嘉人  (Chikaraishi Yoshito)  (50455490)	北海道大学・低温科学研究所・教授   (10101)	
研究 分担者	千葉 洋子  (Chiba Yoko)  (70638981)	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   (82401)	

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