

一方で炭酸ガスを同化して生体成分としているのは独立栄養生物だけではない。我々人間も含む従属栄養微生物も炭酸ガスを体内に取り込んでいる。脂肪酸合成の第一段階であるアセチル CoA カルボキシラーゼや TCA サイクルの補充反応である PEP カルボキシラーゼ反応がその良い例である。これらの反応がいずれも独立栄養微生物による炭酸同化反応に利用されている事実も興味深い。本特集では吉田らの従属栄養微生物による特異なカルボキシラーゼ反応による炭酸ガスの有機化を取り

上げた。この他にも、最近まであまり本格的に取り上げられることがなかったが、グルタミン酸発酵における TCA サイクル補充反応による炭酸固定はこの発酵の効率を論じるうえできわめて重要な反応であり、さらにそのような例は他にも見受けられると考えられる。

本特集が、微生物の炭酸固定の持つ意義と可能性を見直すきっかけになればと期待しています。最後に、ご多忙中にも関わらず貴重な原稿をお寄せ頂いた4組の筆者の先生方に深く感謝致します。

微生物における独立栄養的炭酸固定経路の多様性

石井 正治

地球上における炭素循環において、炭酸ガスはそのまま酸化された形態かつ安定な分子として気相中あるいは水圏中に存在する。炭酸ガスという安定な化合物が気相中に存在するため、炭素は太陽エネルギーにより引き起こされる大気循環により地球上にくまなく存在しうることとなる。逆に言えば、独立栄養的な生育が可能な生物への炭酸ガスの供給が、大気循環により賄われていることになる。¹⁾大気循環に依らない残りの部分は、地熱環境などにおける地殻からの炭酸ガス供給に依存しているものと推測される。

安定な炭酸ガスを生体構成成分に還元するためには、当然のことながらエネルギー供給システムと適切な物質変換システムの存在が必須である。物質変換システムのうち、サイクリックな系ならびに炭酸ガス以外の基質を必要としない一方通行的な系が、独立栄養的炭酸固定経路として機能しう。炭酸ガス以外の基質を必要としない一方通行的な系では、基質が存在している限りは炭酸固定反応を触媒できるが、独立栄養的炭酸固定経路としては機能しない。ところが、こうした反応が従属栄養生物においても補充反応を代表として数多く見いだされることから炭酸固定反応の生体における重要性は自明なものである。

本稿では、生物炭酸固定反応のうち独立栄養的炭酸固定経路に内容を絞り込む。すなわち、これまでに知られている経路について概説した後、アセチル-CoA 経路ならびに還元的 TCA サイクルについて詳述する。なお、3-ヒドロキシプロピオン酸サイクルならびにカルビン-ベンソンサイクルの詳細については、跡見氏の稿を参考にされたい。

独立栄養的炭酸固定経路^{2,3)}

これまでに知られている独立栄養的炭酸固定経路には以下の4種類がある。

- (1) カルビン-ベンソンサイクル
- (2) 3-ヒドロキシプロピオン酸サイクル
- (3) アセチル-CoA 経路
- (4) 還元的 TCA サイクル

その名前が物語っているように、アセチル-CoA 経路だけが一方通行的な経路であり、残り3種はサイクルを形成している経路である。

安定な炭酸ガスを有機物質として取り込むためのそれぞれの経路の戦略は以下の通りである。

- (1) カルビン-ベンソンサイクル：炭素数5個(C5)の糖リン化合物(リブロース-1,5-2リン酸)を基質として用意し、 $C5 + C1 = 2 \times C3$ なる略反応式で表せる炭酸固定反応により炭酸ガスを有機化している。
- (2) 3-ヒドロキシプロピオン酸サイクル：サイクル中の2カ所の炭酸固定反応において、高エネルギーのCoA化合物(アセチル-CoAあるいはプロピオニル-CoA)を基質に、さらにビオチンを炭酸ガスのキャリアーとして用いている。これにより、本質的な炭酸固定反応をトランスフェラーゼ反応として触媒している。
- (3) アセチル-CoA 経路：他の有機性物質の介在なしに、2分子の炭酸ガスから1分子のアセチル-CoAを生成する経路である。経路の一方では炭酸ガスのメチル基への還元をテトラヒドロ葉酸上で触媒し、他方では炭酸ガスのカルボニル基への還元を触媒し

著者紹介 東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻(助教授) 〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

TEL. 03-5841-8258 FAX. 03-5841-5272 E-mail: amishii@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

ている．最終的には，メチル基・カルボニル基・CoA の3つのコンポーネントを酵素上で縮合させることにより，アセチル-CoA を生合成している．

- (4) 還元的 TCA サイクル：4カ所の炭酸固定反応のうち1カ所は補充反応 (pyruvate carboxylase あるいは phosphoenolpyruvate carboxylase) と同様な反応を用い，もう1カ所は TCA サイクル上の酵素 (isocitrate dehydrogenase) の逆反応を機能させている．残りの2カ所では，フェレドキシンの還元力を用いることで TCA サイクルでは不可逆反応となっている反応を可逆的に触媒している (pyruvate synthase ならびに α -ketoglutarate synthase)．炭酸固定反応という点から見ると，還元的 TCA サイクルでは4種類の経路の中でもっとも複雑に各種酵素系が機能している．

アセチル-CoA 経路

経路の概略を図1に示す．本経路の機能性は主として *Clostridium thermoaceticum* を用いた研究により明らかにされてきた．図の上側では炭酸ガスのメチル基への還元様式が示されており，下側では炭酸ガスのカルボニル基への還元様式が示されている．炭酸ガスのメチル基への還元反応のうち，ホルミル基以降はテトラヒドロ葉酸に結合した状態で触媒を受ける．しかしながら，最終的な還元産物であるメチルトetraヒドロ葉酸がメチル基のドナーにはなるわけではなく，メチルトランスフェラーゼによりメチルトetraヒドロ葉酸からメチル基転移を受けるコリノイドタンパク質が，メチルコリノイドとしてアセチル-CoA 生成反応 (下述) に関与する．

本経路のもっとも特徴的な点は，カルボニル基，メチル基ならびに CoA の3つの基質から，「ブロック組み立て」の要領でアセチル-CoA を合成する反応 (acetyl-CoA synthase 反応) の存在である．このアセチル-CoA 合成の反応機構は *C. thermoaceticum* 由来の酵素を用いた研究により提唱されていた.^{2,4)} センター A 中の鉄にカルボニル基が，ニッケルにメチル基が結合した後，ニッケル上でアセチル基が合成される，とされていた．しかしながら，酢酸を分解するメタン生成菌である *Methanosarcina thermophila* 由来の acetyl-CoA synthase 反応を用いた同じグループの最近の研究では，カルボニル基がニッケルに結合した後，メチル基がさらにニッケルに結合し，引き続きカルボニル基とメチル基がアセチル基に変換を受け，最後に CoA と結合する，という反応機構が提唱されている (図2).⁵⁾

一般的に酵素の反応機構解明のためには，本来の活性を有した酵素タンパク質が大量に必要とされる．そのため，できるならば大腸菌などにおける大量発現系が存在することが望ましい．しかしながら，*C. thermoaceticum* を始めとしてそのような系はこれまで機能していなかった．ところが最近，*C. thermoaceticum* の acetyl-CoA synthase を大腸菌で発現させた後ニッケル存在下で長時間嫌氣的にインキュベートすると，センター A に由来する NiFeS シグナルが観察されるようになっただけでなく (図3)，アセチル-CoA と CO との交換反応も触媒されるようになった (=センター A が機能している) ということが報告された.⁶⁾ アセチル-CoA と CO との交換反応は， $\text{CH}_3\text{-CO-SCoA} + \text{*CO} \rightarrow \text{CH}_3\text{-*CO-SCoA} + \text{CO}$ なる式で表せるものである．上述の「ブロック組み

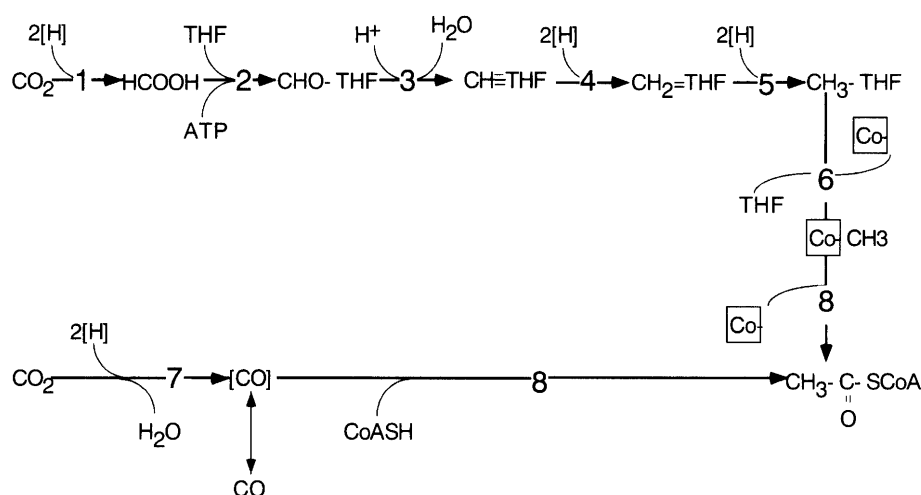


図1. アセチル-CoA 経路. 1, formate dehydrogenase; 2, formyl-THF synthase; 3, methenyl-THF cyclohydrolase; 4, methyl-ene-THF dehydrogenase; 5, methylene-THF reductase; 6, methyltransferase; 7, CO dehydrogenase; 8, acetyl-CoA synthase.

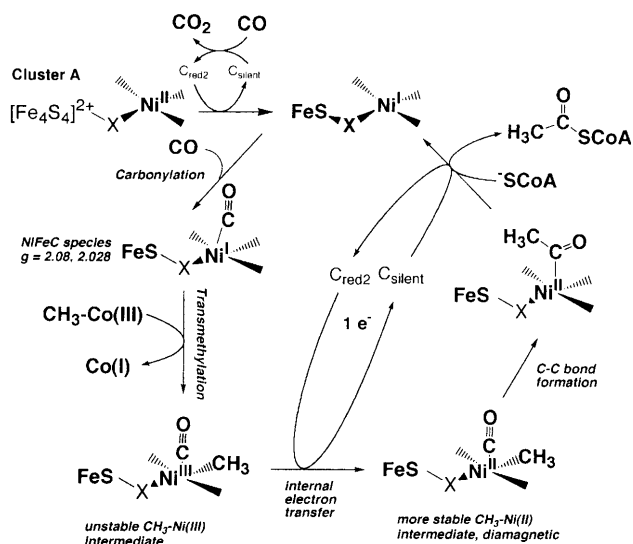


図2. Acetyl-CoA synthase の反応機構 (文献5より)

立て」で考えると「ブロックの組み換え」を含んでいるため、アセチル-CoA 合成の本質的な部分を他のコンポーネントの関与なく観察することが可能な反応系であることに注意したい。この研究結果より、大腸菌を用いた系が機能しうることが判明したため、今後研究のスピードアップと質の充実が図られることであろう。

なお、図中の酵素のうち、methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase (EC 3.5.4.9) は一般的に二機能性酵素であり、methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (EC 1.5.1.5) 活性も併せ持つことが知られている。実際、*C. thermoacetum* の精製酵素も両方の活性を有することが報告

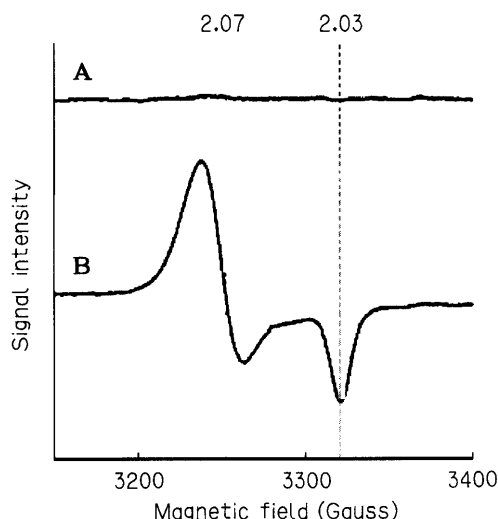


図3. EPR スペクトルによるセンターAの再構成証明 (文献6より)。Aはニッケル添加前のスペクトルを、Bはニッケル処理後のスペクトルを示す。

されている。⁷⁾

還元的 TCA サイクル

経路の概略を図4に示す。本経路の機能性は代謝的には *Thermoproteus neutrophilus* と *Hydrogenobacter thermophilus* で、ゲノミクス的には *Aquifex aeolicus* において実証されている。

T. neutrophilus においては、「低濃度のコハク酸が独立栄養的代謝を攪乱しない」という実験事実を基に、[1,4-¹³C] コハク酸を菌体に取り込ませた後のグルタミン酸、アスパラギン酸ならびにアラニンへのラベルの取り込みパターンをNMRにより解析することにより機能性を調べている。⁸⁾ 結果は、グルタミン酸についてはC3及びC4のシングルラベルの分子種ならびにC3-C4およびC2-C5のダブルラベルの分子種が検出された。アスパラギン酸ならびにアラニンに関しては、C2およびC3のシングルラベルの分子種がそれぞれ検出されている。グルタミン酸のC3-C4ダブルラベルの分子種に関しては、ATP: citrate lyase, aconitase, ならびに isocitrate dehydrogenase が可逆であると考えたと説明でき、他の分子種のラベルパターンは還元的TCAサイクルによりもっともよく説明される。

Aquifex aeolicus のゲノムシーケンス解析結果によると、還元的TCAサイクル関連の相同遺伝子がすべて検出されているが、カルビン-ベンソンサイクルの鍵酵素である ribulosebiphosphate carboxylase/oxygenase (EC 4.1.1.39), アセチル-CoA 経路の鍵酵素である carbon monoxide dehydrogenase (EC 1.2.99.2), さらには3-ヒドロキシプロピオン酸サイクルの鍵酵素である propionyl-CoA carboxylase (EC 6.4.1.3) の相同遺伝子は検出されな

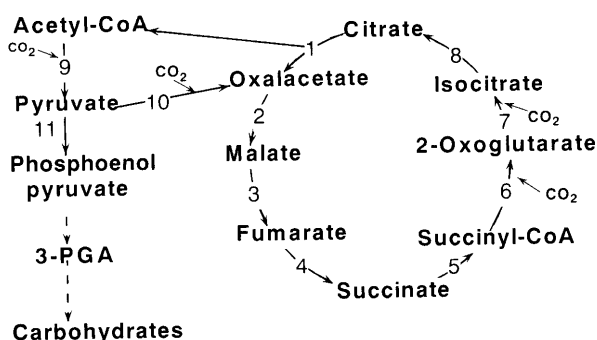


図4. 還元的 TCA サイクル. 1, ATP: citrate lyase; 2, malate dehydrogenase; 3, fumarase; 4, fumarate reductase; 5, succinyl-CoA synthetase; 6, 2-oxoglutarate synthase; 7, isocitrate dehydrogenase; 8, aconitase; 9, pyruvate synthase; 10, pyruvate carboxylase; 11, phosphoenolpyruvate synthetase.

かった⁹⁾ (詳細は KEGG の下記該当アドレスから Carbon fixation, Methane metabolism あるいは Propanoate metabolism の項を参照戴きたい: http://star.scl.genome.ad.jp/dbget-bin/get_htext?A.aeolicus.kegg+B). このことから, *A. aeolicus* においては還元的 TCA サイクルが機能していることが推測された.

H. thermophilus においては, $^{14}\text{CO}_2$ の取り込みパターン,¹⁰⁾ 酵素活性測定,¹⁰⁾ さらには鍵酵素の精製などにより,¹¹⁻¹³⁾ 総合的に還元的 TCA サイクルの機能性が証明されている. Pyruvate synthase ならびに α -ketoglutarate synthase については, 遺伝子のクローニングも終了している. Pyruvate synthase ではフェレドキシン様モチーフを有する ORF に引き続き δ - α - γ - β なる遺伝子構造を有していることが明らかとなった. 当初我々は, フェレドキシン様モチーフを有する ORF によりコードされているタンパク質を文字通りフェレドキシンと考えていたが, 大腸菌における発現実験などから, この ORF は pyruvate synthase のサブユニットの一つであろうと考え始めている. α -ketoglutarate synthase においては, タンパク質的に検出された酵素をコードする遺伝子上流逆向きにピルベートシンターゼとホモロジーを有する遺伝子群が存在することが明らかとなった. 大腸菌でこの遺伝子群を発現させたところ, α -ketoglutarate: MV oxidoreductase 活性を有しており pyruvate: MV oxidoreductase 活性を示さなかった. このことから, *H. thermophilus*

には少なくとも 2 種類の α -ketoglutarate synthase が存在することが示唆された.

上述の *H. thermophilus* の還元的 TCA サイクルに関する一連の研究では, *in vitro* での炭酸固定をはっきりとした形では未だ示すことができておらず, 今後の第一の研究課題と考えている.

還元的 TCA サイクルに関連する他の研究結果としては, ATP: citrate lyase に関するものがある.^{14,15)}

文 献

- 1) 石井正治, 五十嵐泰夫: 環境管理, **35**, 532 (1999).
- 2) 石井正治, 五十嵐泰夫: 農化, **72**, 514 (1998).
- 3) 石井正治: 農化, **72**, 1165 (1998).
- 4) Kumar, M. *et al.*: *Science*, **264**, 817 (1994).
- 5) Murakami, E. and Ragsdale, S.W.: *J. Biol. Chem.*, **275**, 4699-4707 (2000).
- 6) Loke, H.-K. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 12530 (2000).
- 7) Ljungdahl, L.G. *et al.*: *Methods Enzymol.*, **66**, 599 (1980).
- 8) Schafer, S. *et al.*: *Eur. J. Biochem.*, **184**, 151 (1989).
- 9) Deckert, G. *et al.*: *Nature*, **392**, 353 (1998).
- 10) Shiba, H. *et al.*: *Arch. Microbiol.*, **141**, 198 (1985).
- 11) Ishii, M. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **171**, 1788 (1989).
- 12) Yoon, K.-S. *et al.*: *Arch. Microbiol.*, **167**, 275 (1997).
- 13) Yoon, K.-S. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **178**, 3365 (1996).
- 14) Wahlund, T. M. and Tabita, F. R.: *J. Bacteriol.*, **179**, 4859 (1997).
- 15) Kanao, T. *et al.*: *Eur. J. Biochem.*, **268**, 1670 (2001).

微生物の Calvin-Benson 回路と 3-Hydroxypropionate 回路

跡見 晴幸・今中 忠行*

Calvin-Benson 回路と Rubisco

地球上には実に多種多様な生物が生息しているが, それらは共通に糖・脂質・核酸・タンパク質などの有機炭素化合物を主構成成分としている. これら有機炭素化合物のほとんどは地球から (非生物的に) 供給されるのではなく, 生物自身が無機炭素 (主に O_2) を還元することによってそれらを合成している. 代表的な例は植物, 藻類や光合成細菌であり, これらは光のエネルギーを用いて, 二酸化炭素の還元・同化 (炭酸固定) を行っている. これらの光独立栄養生物が合成した有機物は地表に存在するすべての従属栄養生物の栄養源となるのである. ここでは炭酸固定系として知られている 4 種の経路の内, Calvin-Benson 回路 (特に始原菌の Rubisco) および 3-hydroxypropionate 回路について紹介したい.

光独立栄養生物の炭酸固定のメカニズムは盛んに研究され, そのほとんどは ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) を鍵酵素とする Calvin-Benson 回路 (Fig. 1) によって炭酸固定を行っている. したがって, 地表の生態系はこの 1 つの酵素 Rubisco に依存していると言っても過言ではない. Rubisco は地球上でもっとも多く存在する酵素であり, 地球表面上の無機炭素と有機炭素の玄関なのである.^{1,2)}

Rubisco は ribulose 1,5-bisphosphate と CO_2 から 2 分子の phosphoglycerate (3-PGA) を生成する反応 (carboxylase) を触媒し, 光合成暗反応のもっとも重要な酵素であると考えられている. CO_2 の代わりに O_2 も基質とな

*著者紹介 (代表) 京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻 (教授) 〒606-8501 京都市左京区吉田本町
TEL. 075-753-5568 FAX. 075-753-4703 E-mail: imanaka@sbchem.kyoto-u.ac.jp