

総 説

還元的 TCA 回路の鍵酵素 ATP-citrate lyase について

金 尾 忠 芳

(生物機能開発学講座)

ATP-citrate lyase: The key enzyme of the reductive TCA cycle

Tadayoshi Kanao

(Department of Biological function)

Almost all organic compounds which construct life are derived from carbon dioxide (CO_2) assimilated by autotrophic organisms. The reductive tricarboxylic acid (RTCA) cycle functions as a carbon dioxide fixation pathway, distinct from Calvin cycle, in a green sulfur bacterium *Chlorobium limicola*. ATP-citrate lyase (ACL) is one of the key enzymes of this cycle. The enzyme of *C. limicola* (Cl-ACL) was encoded in two adjacent open reading frames, *acIB* (1197 bp) and *acIA* (1827bp), whose products showed significant similarity to the N- and C-terminal regions of the human enzyme, respectively. Heterologous expression of these genes in *Escherichia coli* proved that both gene products were essential for ACL activity. Kinetic examination of the enzyme revealed that the enzyme displayed typical Michaelis-Menten kinetics toward ATP with an apparent K_m value of 0.19 mM. However, strong negative cooperativity was observed with respect to citrate binding. ADP was a competitive inhibitor of ATP with a K_i value of 0.036 mM. Together with the feature that the enzyme catalyzed the reaction only in the direction of citrate cleavage, these kinetic properties indicated that Cl-ACL can regulate both the direction and carbon flux of the RTCA cycle in *C. limicola*.

Key words : CO_2 fixation, Reductive TCA cycle, ATP-citrate lyase

はじめに

二酸化炭素を主要な炭素源として生育する生物は「独立栄養生物」と呼ばれている。我々を含む従属栄養生物は、食物としてこの独立栄養生物あるいはその生産物を「同化」することで生命を維持しており、全ての生物を構成している有機物は、ほとんど全て独立栄養生物が固定した二酸化炭素に由来していると言うことができる。従って、独立栄養生物の存在無くして我々は存在し得ないと言っても過言ではない。そしてこの独立栄養生物が一次生産者としてその環境における生態系を支えている。我々の身近な環境、すなわち常温・常圧・中性・好気といった条件下においては、植物がその環境（生態系）を支えている。

一方、地球上には上記のような環境は地表面のごく限られた空間にしかなく、高温・高圧・強酸（強アルカリ）・絶対嫌気など極限環境と呼ばれる世界が深海・深度地下などに広く分布している。前世紀後半より、このような環境に対する調査が活発に行われ、それまで生物は存在しないと考えられていた常識を覆し、豊かな生態系を形成している環境も発見され、特に地下数kmまでの深度地下

環境には地表面の数百倍のバイオマスが存在するとさえ考えられるようになった¹⁾。

極限環境において植物の生育は困難であり、その生態系は微生物を主体としている。特に一次生産においては独立栄養細菌（始原菌を含む）が担っており、これらの存在は非常に重要であることは明らかであろう。注目したいのは、これらの持つ炭酸固定代謝の多様性にある。植物がカルビン回路によって炭酸固定を行っているのに対し、微生物はカルビン回路のほか acetyl-CoA 経路²⁾、3-hydroxypropionate 回路³⁾、そして還元的 TCA 回路⁴⁾の3種類の炭酸固定代謝を利用していることが現在知られている。また光を利用する光合成だけでなく、無機物を酸化する化学合成によってエネルギーを獲得するものも数多く存在する。特に水素酸化細菌の一種は世代時間が約1時間で植物を遥かに凌ぐ炭酸固定能を有している⁵⁾。

我々がこれらの炭酸固定代謝を理解することにより、地球規模での炭素循環の全体像を把握するだけでなく、近年大きな問題となっている二酸化炭素による地球温暖化への生物炭酸固定による解決（これは同時に食料問

題などの解決にも関わる)への可能性を広げることができる。しかしながらこの様な非カルビン型の炭酸固定代謝に対する我々の知見は浅く、とりわけ還元的 TCA 回路において研究が遅れていた。今回、非カルビン型炭酸固定代謝経路の一つ、還元的 TCA 回路とその鍵酵素である ATP-citrate lyase に関する知見をまとめたので報告する。

還元的 TCA 回路

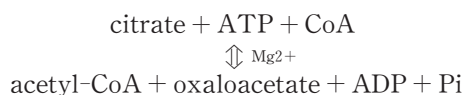
還元的 TCA 回路は1960年代に緑色硫黄細菌 *Chlorobium limicola* において発見された非カルビン型炭酸固定代謝経路である。本回路は見かけ上、我々の良く知る TCA 回路を逆方向へ回転することでエネルギーと還元力を消費して炭酸固定を行う (Fig. 1)。この回路が1回転するときに4分子の二酸化炭素が固定され1分子のオキサロ酢酸 (または2分子の二酸化炭素から1分子の acetyl-CoA) が生成する。本回路においては2つの特徴的な炭酸固定酵素 pyruvate synthase, 2-oxoglutarate synthase および回路の方向を決定していると考えられる ATP-citrate lyase が鍵酵素として認識されている。

本回路は1960年代に発見されたにもかかわらず、その後の研究は鍵酵素の精製などが数例報告されるのみであった。特に水素酸化細菌の一種、*Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 が還元的 TCA 回路を用いて独立栄養生育を行っていることが明らかになり⁵⁾、鍵酵素の精製と還元力の同定が試みられた。放射性同位元素を含む $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ を用いた炭酸固定の実験から pyruvate

synthase, 2-oxoglutarate synthase は共に還元力としてフェレドキシンを用いることを確認し、*in vitro* における炭酸固定反応に成功した⁶⁾。この結果より、pyruvate synthase, 2-oxoglutarate synthase は pyruvate: ferredoxin oxidoreductase, 2-oxoglutarate: ferredoxin oxidoreductase と命名された。もう一つの鍵酵素である ATP-citrate lyase については後ほど詳しく述べるとして、本回路に関わる酵素の研究としては、緑色硫黄細菌 *C. limicola* において isocitrate dehydrogenase (IDH) についての報告がある⁷⁾。本酵素は TCA 回路においても脱炭酸酵素として働き、広く生物に存在して (一部の始原菌には確認されていない) 詳細な研究が行われてきたが、炭酸固定酵素として捉えた研究はほとんど行われていなかった。*C. limicola* 由来の本酵素は分子量約80,000のモノマー構造であり、NADP (H) を補酵素として炭酸固定・脱炭酸反応の両方を触媒する。しかしながら従属生物である酵母由来の同酵素と比較すると、二酸化炭素に対する親和性が高く (K_m 値は約1.3mM、酵母 IDH は約8.2mM) また細胞内の pH (中性付近) で炭酸固定反応が至適となり、酵母 IDH と比較してより炭酸固定反応に適した酵素であることが明らかとなった。また回路の中間代謝物であるオキサロ酢酸によって顕著に阻害されることから、IDH が本回路の炭酸固定代謝の調節に関与していることが示唆された。還元的 TCA 回路における IDH の研究は *H. thermophilus* においても報告されている⁸⁾。*H. thermophilus* においては分子量約46,000のホモダイマー構造であり、NADH を補酵素として脱炭酸反応を行う。興味深いことに *C. limicola* の IDH が平衡反応で炭酸固定反応も触媒できるのに対し、*H. thermophilus* の IDH は単独では炭酸固定反応を触媒できず、炭酸固定反応においては carboxylating factor for IDH (CFI) と呼ばれるビオチン化タンパク質と ATP の働きが必須であることが分かった。

ATP-citrate lyase (ACL)

ATP-citrate lyase (ACL) は succinyl-CoA synthetase 等と同じ acyl-CoA synthetase family に属する酵素であり、以下の反応を触媒する。



この反応は3つの段階から成る。まず、酵素が ATP-Mg^{2+} 複合体によりリン酸化される第一段階。続いてリン酸化された酵素により、クエン酸のリン酸化が起こる第二段階。そして最後に、この citryl- PO_4 に CoA-SH が攻撃して citryl-CoA を中間体として、これがクライゼン反応の逆反応により開裂して acetyl-CoA とオキサロ酢酸を生成する第三段階である。

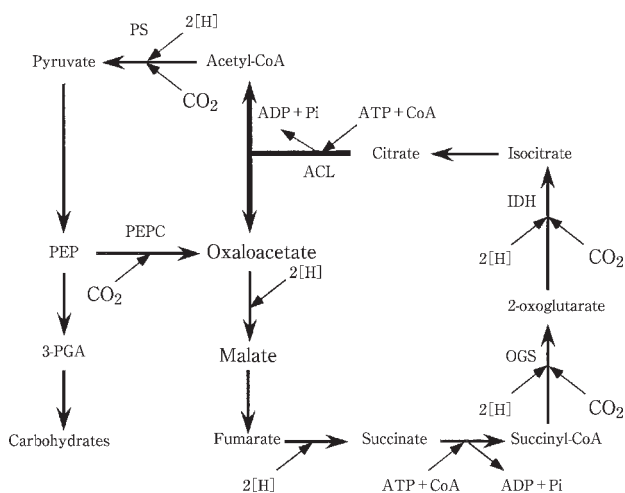


Fig. 1 The reductive tricarboxylic acid (RTCA) cycle for CO_2 assimilation in *C. limicola*.

The reaction catalyzed by ATP-citrate lyase is indicated with a bold arrow. PS; pyruvate synthase, PEPC; phosphoenolpyruvate carboxylase, OGS; 2-oxoglutarate synthase, and IDH; isocitrate dehydrogenase are key enzymes for CO_2 fixation. PEP; phosphoenolpyruvate, 3-PGA; 3-phosphoglycerate.

1. 真核生物の ACL

本酵素は真核生物において動物、植物、酵母、カビなど広く分布しており、細胞質内に局在している。真核生物のように細胞内が小器官により仕切られている場合、acetyl-CoA は pyruvate dehydrogenase や β -酸化によって、主にミトコンドリア内で生成する。acetyl-CoA はミトコンドリア膜を透過することができず、クエン酸として細胞質内に供給される。細胞質内で合成される脂肪酸やコレステロールなどの原料となる acetyl-CoA は、このクエン酸から ACL の働きで供給される。また acetyl-CoA と同時に生成する ACL のもう一つの反応産物であるオキサロ酢酸は、糖新生の重要な基質であり、特に脂肪細胞において血糖値の減少時に脂肪から糖への変換に ACL が重要な働きを担っている。このような働きから真核生物の ACL は、高脂血症や高血圧に関わる酵素として医学的にも注目され、ヒトやネズミなど哺乳類において古くから詳細に研究が行われてきた。ヒトの ACL は 3318bp (1105アミノ酸) にコードされた 480kDa の同一サブユニットから成るホモ 4 量体構造であり⁹⁾、cAMP、グルカゴン依存性の protein kinase によってリン酸化される残基 (T 446, S 450, S 454) が存在する^{10,11)}。これら残基のリン酸化によって基質に対する K_m 値や反応速度論的パラメーターが変化し、前述した脂肪細胞における脂肪からの糖新生など、重要な代謝調節を行っていることも明らかとなった¹²⁾。ACL は哺乳類や酵母では同一サブユニットから形成されているが、カビの 1 種 *Sordaria macrospora* の ACL は異なる 2 つのサブユニットから構成されるヘテロ構造であることが明らかとなった。更にそれぞれのサブユニットの一次構造は、哺乳類由来の ACL の N-末および C-末領域に対応した高い相同性があることが分かった¹³⁾。ACL 活性が欠損した *S. macrospora* 変異株は、子実体の形成に障害を起こす。これは子実体が形成され成熟する際に必要とされる脂肪酸は主に ACL によって供給される細胞質内 acetyl-CoA に由来するため、この供給が ACL 活性欠損変異株では十分に行われないためであると考えられた¹⁴⁾。

2. 原核生物の ACL

真核生物の ACL は細胞質内への acetyl-CoA など供給する働きを持つことを述べたが、細胞内が小器官で仕切られていない原核生物の場合は、その役割は一変する。これまでに原核生物 (細菌および始原菌) において ACL 活性は還元的 TCA 回路により独立栄養生育を行う生物にしか検出されていない。つまり大腸菌や枯草菌に ACL は存在せず、原核生物では還元的 TCA 回路に特徴的な鍵酵素であると言える。またその反応様式から、回路の回転方向を決定していることが推定された。原核生物では、最初に還元的 TCA 回路が提唱された絶対嫌気性光合成細菌の緑色硫黄細菌 *Chlorobium* と好熱性水素酸化細菌 *H. thermophilus* において詳細な研究が行われ

た。まず、筆者が研究に携わった緑色硫黄細菌の ACL について述べたい。

2.1.1. 緑色硫黄細菌の ACL

前述したように、還元的 TCA 回路は緑色硫黄細菌から提唱されており、その鍵酵素である ACL は古くから無細胞抽出液において活性が検出されていた¹⁵⁾。しかしながら、酵素の精製の報告は 1982 年に部分精製されただけで、長い間報告されることはなかった (分子量 240kDa と推定され、いくつかの性質検討がなされた)¹⁶⁾。それから 20 年近く過ぎた 1997 年中等度好熱性緑色硫黄細菌 *Chlorobium tepidum* において単一精製がなされた¹⁷⁾。その結果、分子量は 135kDa のホモ 4 量体構造であり、SDS-PAGE 後の Western 解析やタンパク質のリン酸化実験などにより主に 65kDa, 42kDa のタンパク質に分解すると考えられていた。しかしながら、その後、中温性の緑色硫黄細菌 *C. limicola* より ACL 遺伝子が原核生物で初めて単離されると¹⁸⁾、これは単一のサブユニットからなるホモ構造ではなく、異なる 2 つの隣り合った ORF の遺伝子産物 (65kDa, 43kDa) をサブユニットとしたヘテロ構造であることが明らかになった。また TIGR microbial database において *C. tepidum* の全ゲノム解析が既に行われているが、その ORF は 135kDa のタンパク質をコードしたものではなく、*C. limicola* 同様に異なる 2 つの ORF によってコードされていることが明らかとなった。また、*C. limicola*, *C. tepidum* 両者の ACL 両 ORF から推定される一次構造の相同性は 90% 以上であった。興味深いことにそれぞれの ORF (*aclB*: 1197bp, *aclA*: 1827bp) から推定されるタンパク質の一次構造はヒト由来の ACL の一次構造の N-末および C-末部分と高い相同性があり、前述したヒト ACL における cAMP やホルモン依存性のプロテインキナーゼによるリン酸化部位は、丁度 *aclBA* の間に位置されていた。 (Fig. 2) さらに *aclA*, *aclB* を別々に発現した場合、ACL 活性が検出されないことから両遺伝子は活性に必須であることが分かった。精製酵素の分子量をゲル濾過法により求めたところ、*C. tepidum* のものと同様の 530~550kDa と計算された。この場合 $\alpha_5\beta_5$ のヘテロ 10 量体と考えられる

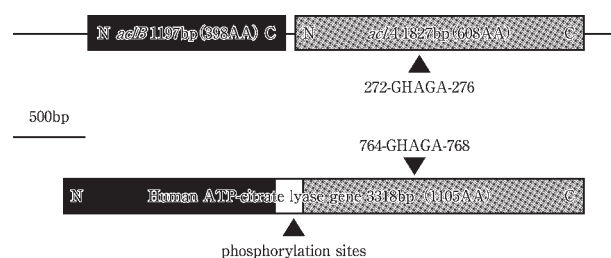


Fig. 2 Structure of ACL genes from *C. limicola* and human. The phosphorylation sites in human ACL indicate T446, S450, and S454 which were phosphorylated by protein kinases.

が、ヒト由来 ACL の一次構造と比較した結果から考えると $\alpha_4\beta_4$ のヘテロ 8 量体と考える方が妥当である。また後述するが、反応速度論的解析は $\alpha_4\beta_4$ のヘテロ 8 量体構造を支持する結果となった。

2.1.2. C. limicola 由来組み換え型 ACL の性質検討¹⁹⁾

組み換え大腸菌による ACL 遺伝子の大量発現ができたことから、これを精製し詳細な解析を行った。精製した本酵素に対し、逆反応である citrate synthase 活性を複数の方法で検討したが、いずれも検出することはできなかった。従って ACL は、クエン酸開裂反応を特異的に触媒し、この反応の推定通り回路の回転方向を決定づける役割を担っていることを強く示唆した。反応速度論的解析の結果、基質の ATP に対して典型的な Michaelis-Menten 型の速度論形式を示し、逆数プロットによって求められた K_m 値は 0.21 ± 0.04 mM、 V_{max} は 3.7 ± 0.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ と算出された。また、本酵素反応が ADP によって顕著に阻害されることから、同様に求めた逆数プロットは ATP に対する競争阻害の様式を示し、その K_i 値は 0.037 ± 0.006 mM であった。(Fig. 3)

一方、もう一つの基質であるクエン酸に対しては、逆数プロットで直線に乗らず Michaelis 型に当てはまらない様相を呈した (Fig. 4-A)。そこで Hill plot により解析した結果、その係数は 0.45 であった (Michaelis 型では係数が 1 となる) (Fig. 4-B)。このことから本酵素とクエン酸の結合-解離には、負の協同性があることが示された。負の協同性は、オリゴマー構造を持つ酵素において見られる現象であり、本酵素はヒト ACL (ホモ 4 量体) との相同性から $\alpha_4\beta_4$ 、つまり $\alpha\beta$ の 4 量体構造であると考えられる。各サブユニットにおけるクエン酸の結合部位とクエン酸 (基質) 分子の解離-結合は、4 量体

の場合以下の式に従う。

$$v/V_{\max} = \frac{([S]/K_s + 3[S]^2/aK_s^2 + 3[S]^3/a^2bK_s^3 + [S]^4/a^3b^2cK_s^4)}{(1 + 4[S]/K_s + 6[S]^2/aK_s^2 + 4[S]^3/a^2bK_s^3 + [S]^4/a^3b^2cK_s^4)} \quad [1]$$

この式において、 K_s は酵素基質複合体の解離定数、 a 、 b 、 c 、はそれぞれ 2、3、4 番目の基質結合部位にクエン酸が結合 (解離) するための相関係数である。

従って、1 つ目のサブユニットにおける基質結合部位と基質 (クエン酸) との解離定数 K_{s1} は $K_{s1} = K_s/4$ であり、2 つ目以降はそれぞれ $K_{s2} = a^2 K_s/3$ 、 $K_{s3} = ab^3 K_s/2$ 、 $K_{s4} = abc^4 K_s$ と表される。[1] 式の $[S]$ および v に各実測値を代入し、回帰曲線をグラフソフトを用いて計算した。この結果、入力した数値にほぼ完全

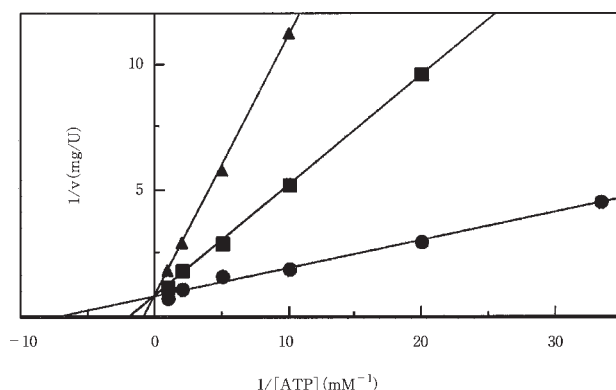


Fig. 3 Double-reciprocal plots for various concentrations of ATP with or without ADP.

ADP concentrations were 0 mM (circle), 0.1 mM (square), and 0.3 mM (triangle).

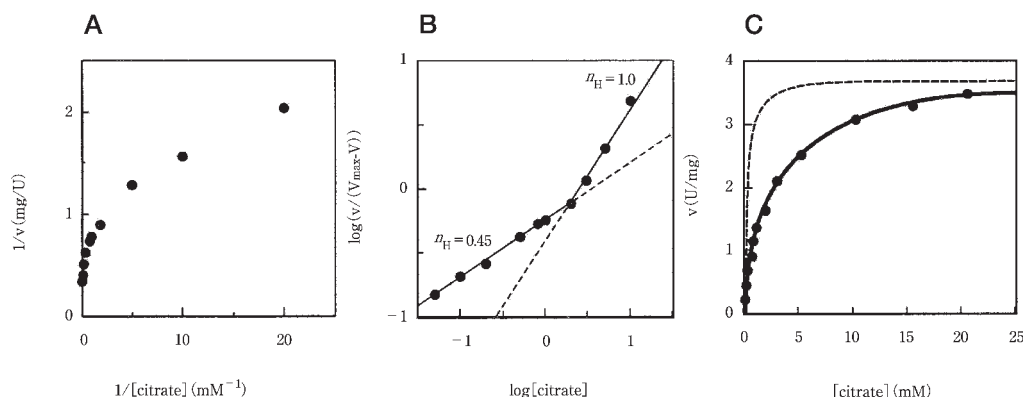


Fig. 4 Kinetic analysis of recombinant Cl-ACL with citrate.

(A) Double-reciprocal plot of the kinetic data. (B) Hill plot of the kinetic data. Hill coefficients are indicated as n_H values. The n_H value of 0.45 is given in the lower citrate concentrations (0.05 to 2 mM). (C) Velocity plot with various concentrations of citrate. The solid curve was fitted by nonlinear regression analysis of the experimental data as described in the text. The dotted line represents a calculated curve of activity if the enzyme were to follow typical Michaelis-Menten kinetics.

に一致する回帰曲線 ($R^2 = 0.999$) が得られ (Fig. 4-C), これより各定数を算出した. それぞれの値は, $K_{s1} = 0.057 \pm 0.008 \text{ mM}$, $K_{s2} = 1.3 \pm 0.4 \text{ mM}$, $K_{s3} = 18 \pm 20 \text{ mM}$, $K_{s4} = 1.6 \pm 2.0 \text{ mM}$ と求められた. これら各サブユニットにおける基質との解離定数から検討すると, K_{s3} が $18 \pm 20 \text{ mM}$ と極端に大きくなっている. このために実際の反応においては, 酵素基質複合体が, 基質の濃度に応じて 1, 2, 4 つのサブユニットで複合体を形成することが予想される. 事実, Hanes plot ($[s] - [s]/v$ plot) で実測値を表した場合, クエン酸の濃度によって 3 本の回帰直線でプロットが表される (Fig. 5). 3 本の回帰直線から求められる $V_{\max}$ は, 基質濃度が $0 \sim 0.2 \text{ mM}$ において $0.94 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, $0.2 \sim 2.0 \text{ mM}$ において $1.87 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 2.0 mM 以上では $4.00 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ と算出された. つまりクエン酸濃度が $0 \sim 0.2 \text{ mM}$ の範囲では 4 つのサブユニットの内 1 つのみ, $0.2 \sim 2.0 \text{ mM}$ では 2 つのサブユニットが基質と結合する, そして 2 mM よりも高い濃度では全てのサブユニットに基質が結合していることが $V_{\max}$ から容易に推定できる. すなわち「負の協同性」とは 1 つのサブユニットに基質が結合すると, 他のサブユニットに結合する基質の親和性を下げる作用であると考えられる. 生理的には, 炭酸固定代謝による急激な基質 (クエン酸) 濃度の上昇に対して過剰に回路を駆動しない, つまり十分なクエン酸存在下において炭酸固定代謝に余分な ATP を消費しない様に本回路におけるバルブの働きをしていると考えられた. また ADP によって顕著な阻害を受けることから, 細胞内

のエネルギー状態にも依存して回路を制御していることが考えられた. 本菌の ACL は還元的 TCA 回路の回転方向を決定し, 細胞内のエネルギー状態によって炭素の流れの方向と流量 (carbon flux) を調節する重要な役割を担っていることが明らかとなった.

2.2. 水素酸化細菌 *H. thermophilus* TK-6 の ACL

水素酸化細菌 *H. thermophilus* TK-6 は, 好熱性好気性水素酸化細菌であり還元的 TCA 回路が好気条件下で機能している珍しい例である. 本菌の ACL は 1989 年に精製が試みられ, 分子量 46 kDa のホモ 6 量体構造であると報告されていた²⁰⁾. しかしながら *H. thermophilus* において ACL 活性を再検討した結果, 単一の酵素反応ではなく 2 つの酵素から成る 2 段階の反応であることが明らかとなった^{21,22)}. 従来 ACL 活性は, 生成物の oxaloacetate を malate dehydrogenase とカップリングして減少する NADH の吸光度 ($A_{340\text{nm}}$) 測定する MDH 法, およびもう一つの生成物である acetyl-CoA をヒドロキシルアミンと三価鉄で錯体を形成させて定量する hydroxamate 法 (HD 法) の 2 通りで検出することができる.

(注: HD 法は acetyl-CoA の他 succinyl-CoA などの acyl-CoA の定量と検出が可能.) *H. thermophilus* では ACL 活性を HD 法により追跡して精製した場合, 精製タンパク質は MDH 法では活性を示さなかった. すなわち oxaloacetate が生成されていないことが示唆された. この精製タンパク質の生成物を MALDI-TOF MS など分析した結果, citryl-CoA であることが分かった. 従って, この精製タンパク質は ACL ではなく citryl-CoA

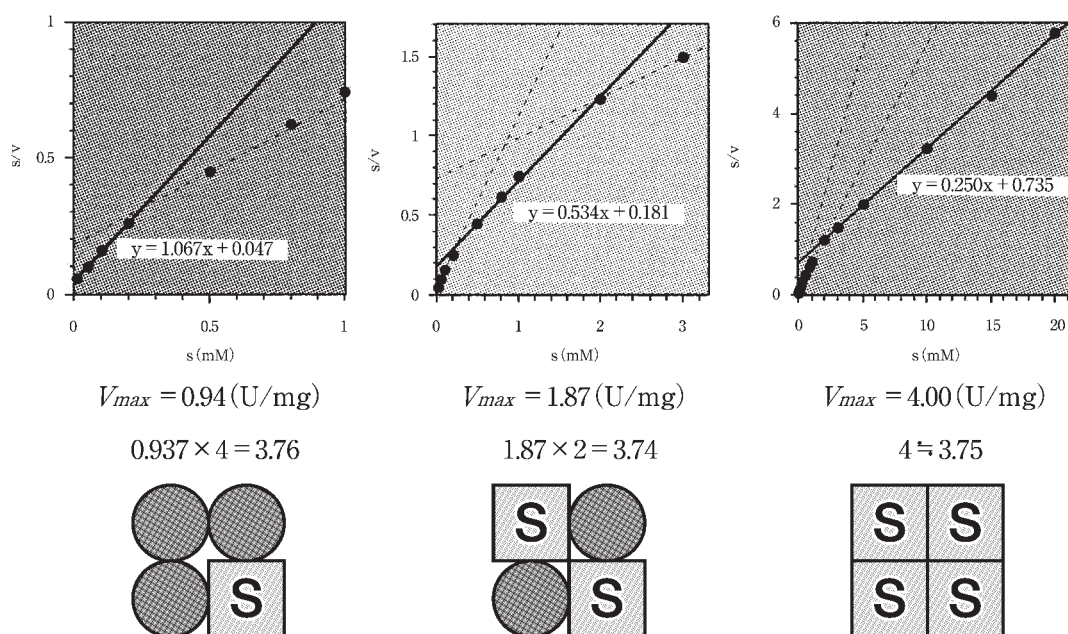


Fig. 5 Hanes plots of the kinetic data.

The panels of left, middle, right are focused on lower ($0 \sim 1 \text{ mM}$), middle ($0 \sim 3 \text{ mM}$), higher ($0 \sim 20 \text{ mM}$) concentrations of citrate, respectively. The estimated enzyme-substrate complexes are indicated below each panel.

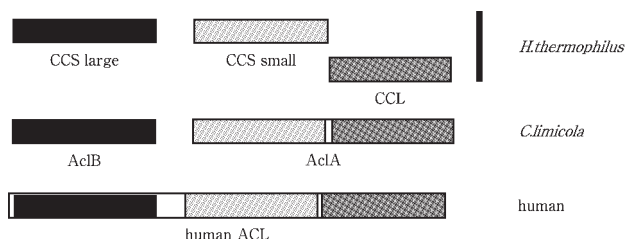


Fig. 6 Structural similarity between citryl-CoA synthetase (CCS), citryl-CoA lyase (CCL), and ATP-citrate lyase (ACL).

The boxes with same colors (black, light gray, and dark gray) show high similarity.

synthetase (CCS)と同定された。CCSは46 kDa, 36 kDaのヘテロ構造であり、その一次配列は *C. limicola* ACLや大腸菌 succinyl-CoA synthetase と高い相同性を有していた。(Fig. 6) 更に CCS を用いて MDH 法による無細胞抽出液の活性を追跡することで citryl-CoA lyase を精製することに成功した。本酵素は分子量30 kDa のホモ3量体構造と推定され、興味深いことにその一次構造は *C. limicola* AclA のC-末部分に高い相同性を示した。

(Fig. 6) *H. thermophilus* は進化系統樹の根に近い部分より分岐しており、比較的進化の源流に近い細菌であると考えられている。*C. limicola*, *H. thermophilus* の ACL, CCS, CCL を比較すると、*C. limicola* の ACL は還元的 TCA 回路を発達させる過程において CCS と CCL を融合したと推測される。さらに citrate synthase や succinyl-CoA synthetase などの酵素との構造的な類似性を考えると、これらについては進化的見地からも興味深いものである。

おわりに

はじめにも述べたが、全ての生態系において、そこに独立栄養生物の存在無くしては成立しない。たとえ予め豊富な有機物が存在したとしても、従属栄養生物のみでは時間と共に衰退する運命にある。つまり生物が有機物で構成されている以上、無機物から有機物を合成できる独立栄養生物は、必要不可欠な存在である。ある環境に存在する生態系は、そこに存在する独立栄養生物に依存して、多種多様な様相を呈することになる。逆に言えば、独立栄養生物が生態系を生み出す環境を作っているものであり、事実彼らの役割は、単に炭素源を供給するだけではないことが明らかになってきた。20世紀以降、我々の活動が環境に与える負荷は加速度的に重くなっており、環境への様々な問題が湧出している。その一方で、我々の環境に対する意識は高まって来ており、省エネルギー・リサイクル・環境修復などの様々な技術の向上が、近年強く望まれるようになった。

農学部に所属する我々は、これらの問題に対して生物

的な技術開発により対応することが可能であり、また課せられた多くの使命の内の一つとも言える。このような貢献を果たすためには、先ず生態系を形成し維持している多くの独立栄養生物についての理解が必要である。彼らの持つ独特の、また有用な代謝や酵素について解明し、遺伝資源を開発することがその第一歩であり、その様な研究が発展していくことを期待している。今回紹介した還元的 TCA 回路についても、それを理解するには極小さなものではあるが、踏み出さなくては始まらない大きな一歩であると考えている。

文 献

- 1) Predersen, K. : Exploration of deep intraterrestrial microbial life : current perspectives. FEMS Microbiol. Lett., **185**, 9-16 (2000)
- 2) Ragsdale, S. W. : Enzymology of the acetyl-CoA pathway of CO₂ fixation. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., **26**, 261-300 (1991)
- 3) Strauss, G. and G. Fuchs : Enzymes of a novel autotrophic CO₂ fixation pathway in the phototrophic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*, the 3-hydroxypropionate cycle. Eur. J. Biochem., **215**, 633-643 (1993)
- 4) Sirevag, R. : Further studies on carbon dioxide fixation in *Chlorobium*. Arch. Microbiol., **98**, 3-18 (1974)
- 5) Shiba, H., T. Kawasumi, Y. Igarashi, T. Kodama and Y. Minoda : The CO₂ assimilation via the reductive tricarboxylic acid cycle in an obligately autotrophic, aerobic hydrogen-oxidizing bacterium, *Hydrogenobacter thermophilus*. Arch. Microbiol., **141**, 198-203 (1985)
- 6) Yoon K. S., M. Ishii, Y. Igarashi and T. Kodama : Purification and characterization of 2-oxoglutarate : ferredoxin oxidoreductase from a thermophilic, obligately chemolithoautotrophic bacterium, *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. J. Bacteriol., **178**, 3365-3368 (1996)
- 7) Kanao T., M. Kawamura, T. Fukui, H. Atomi and T. Imanaka : Characterization of isocitrate dehydrogenase from the green sulfur bacterium *Chlorobium limicola*. A carbon dioxide-fixing enzyme in the reductive tricarboxylic acid cycle. Eur. J. Biochem., **269**, 1926-1931 (2002)
- 8) Aoshima M., M. Ishii and Y. Igarashi : A novel biotin protein required for reductive carboxylation of 2-oxoglutarate by isocitrate dehydrogenase in *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. Mol. Microbiol. **51**, 791-798 (2004)
- 9) Elshourbagy N. A., J. C. Near, P. J. Kmetz, T. N. C. Wells, P. H. E. Groot, B. A. Saxty, S. A. Hughes, M. Franklin and I. S. Gloger : Cloning and expression of a human ATP-citrate lyase cDNA. Eur. J. Biochem., **204**, 491-499 (1992)
- 10) Ramakrishna S., G. D'Angelo and W. B. Benjamin : Sequence of sites on ATP-citrate lyase and phosphatase inhibitor 2 phosphorylated by multifunctional protein kinase (a glycogen synthase kinase 3 like kinase) . Biochemistry, **29**, 7617-7624 (1990)
- 11) Hughes K., S. Ramakrishna, W. B. Benjamin and J. R. Woodgett : Identification of multifunctional ATP-citrate lyase kinase as the alpha- isoform of glycogen synthase kinase-3. Biochem. J., **288**, 309-314 (1992)
- 12) Potapova I. A., M. R. El-Maghrabi, S. V. Doronin and W.

- B. Benjamin : Phosphorylation of recombinant human ATP : citrate lyase by cAMP- dependent protein kinase abolishes homotropic allosteric regulation of the enzyme by citrate and increases the enzyme activity. Allosteric activation of ATP : citrate lyase by phosphorylated sugars. *Biochemistry*, **39**, 1169-1179 (2000)
- 13) Nowrousian M., U. Kuck, K. Loser and K.-M. Weltring : The fungal *acl 1* and *acl 2* genes encode two polypeptides with homology to the N- and C-terminal parts of the animal ATP citrate lyase polypeptide. *Curr. Genet.*, **37**, 189-193 (2000)
- 14) Nowrousian M., S. Masloff, S. Poggeler and U. Kuck : Cell differentiation during sexual development of the fungus *Sordaria macrospora* requires ATP citrate lyase activity. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 450-460 (1999)
- 15) Evans M. C., B. B. Buchanan and D. I. Arnon : A new ferredoxin-dependent carbon reduction cycle in a photosynthetic bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **55**, 928-934 (1966)
- 16) Antranikian, G., C. Herzberg and G. Gottschalk : Characterization of ATP citrate lyase from *Chlorobium limicola*. *J. Bacteriol.*, **152**, 1284-1287 (1982)
- 17) Wahlund T. M. and F. R. Tabita : The reductive tricarboxylic acid cycle of carbon dioxide assimilation : initial studies and purification of ATP-citrate lyase from the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. *J. Bacteriol.*, **179**, 4859-4867 (1997)
- 18) Kanao T., T. Fukui, H. Atomi and T. Imanaka : ATP-citrate lyase from the green sulfur bacterium *Chlorobium limicola* is a heteromeric enzyme composed of two distinct gene products. *Eur. J. Biochem.*, **268**, 1670-1678 (2001)
- 19) Kanao T., T. Fukui, H. Atomi and T. Imanaka : Kinetic and biochemical analyses on the reaction mechanism of a bacterial ATP-citrate lyase. *Eur. J. Biochem.*, **269**, 3409-3416 (2002)
- 20) Ishii M., Y. Igarashi and T. Kodama : Purification and characterization of ATP : citrate lyase from *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *J. Bacteriol.*, **171**, 1788-1792 (1989)
- 21) Aoshima M., M. Ishii and Y. Igarashi : A novel enzyme, citryl-CoA synthetase, catalysing the first step of the citrate cleavage reaction in *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *Mol. Microbiol.*, **52**, 751-761 (2004)
- 22) Aoshima M., M. Ishii and Y. Igarashi : A novel enzyme, citryl-CoA lyase, catalysing the second step of the citrate cleavage reaction in *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *Mol. Microbiol.*, **52**, 763-770 (2004)