

微生物炭酸固定の多様性とその進化生化学的理解

Diversity of Microbial Carbon Dioxide Fixation Pathways and Biochemical Understanding on Their Evolutional Processes

五十嵐 泰夫 (Igarashi Yasuo)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授



研究の概要

本研究では、主に還元的 TCA 回路で機能する炭酸固定酵素について、それらの酵素が、炭酸固定反応を行えるようになった要因をほぼ解明した。加えて、カルビン回路の鍵酵素を三種類有している水素細菌を材料として、二酸化炭素濃度と炭酸固定酵素発現性との関連を生化学的に解明した。

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：炭酸固定・還元的 TCA 回路・フェレドキシン・RubisCO、窒素同化、進化

1. 研究開始当初の背景・動機

独立栄養的に炭酸固定経路としては四種類が知られていたが、生化学的にはカルビン回路だけが科学的に特徴づけられているに留まっていた。そこで、還元的 TCA サイクルの機能性要因を探ることを中心に、非カルビンの炭酸固定経路の炭酸固定について生化学的研究推進の必要性に思い至った。

2. 研究の目的

本研究では、主に好熱性水素細菌の還元的 TCA 回路で機能する炭酸固定酵素について、それらの酵素が、生物の中心的代謝において普遍的に見られる脱炭酸反応の逆反応、即ち炭酸固定反応を行えるようになった要因を解明し、その進化の道筋を明らかにすることを目的とする。さらに、3-ヒドロキシプロピオン酸回路に特徴的なアセチル-CoA カルボキシラーゼ、アセチル-CoA 経路に特徴的な一酸化炭素デヒドロゲナーゼについても、その分布や作用機作などを追求する。加えて、カルビン回路の鍵酵素を三種類有している中温性水素細菌 *Hydrogenovibrio marinus* を材料として、二酸化炭素濃度と炭酸固定酵素発現性との関連を生化学的に解明する。

3. 研究の方法

手法的にはオーソドックスな生化学的手法を用いている。主な購入備品には Genetic Analyzer がある。

4. これまでの成果

好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* の還元的 TCA 回路について

(1) 2-オキソグルタル酸とイソクエン酸間の反応について

2-オキソグルタル酸の炭酸固定を2-オキソグルタル酸カルボキシラーゼが、またそれに引き続くオキサロコハク酸のイソクエン酸への還元をオキサロコハク酸レダクターゼが触媒していることを明らかにした。

(2) 2-オキソグルタル酸：フェレドキシン オキシドレダクターゼ (OGOR) について

フェレドキシンの還元系に POR 反応(後述)を用い、また生成した2-オキソグルタル酸を反応系外に出すためと NADH の酸化により反応を追跡するために、好熱菌由来のグルタミン酸デヒドロゲナーゼをカップリングさせて、炭酸固定反応を測定した。

H. thermophilus の KOR は好氣的生育条件でも嫌氣的生育条件でも発現していること、並びに FOR は好氣的生育条件にのみ発現していることを明らかにした。

(3) ピルビン酸：フェレドキシン オキシドレダクターゼ (POR) について

フェレドキシン(後述)の還元系に OGOR 反応を用い、また生成したピルビン酸を反応系外に出すためと NADH の酸化により反応を追跡するために、好熱菌由来の乳酸デヒドロゲナーゼをカップリングさせて、炭酸固定反応を測定した。

POR の炭酸固定反応について、EPR を用い詳細な解析を行った。

(4) フマル酸レダクターゼ (FRD) について

FRD を精製し、諸性質を明らかにした。*H. thermophilus* の FRD は NADH を還元力として用いる可溶性の酵素であることを明らかにした。

(5) グルタミンシンターゼ (GS) について

GS を精製し、諸性質を明らかにした。

(6) グルタミンシンターゼ (GOGAT) について

H. thermophilus から GOGAT を精製し、諸性質を明らかにした。なお、特筆すべきは、本菌の GOGAT は非光合成生物として初めてのフェレドキシン依存型酵素、という点である。

(7) Ferredoxin:NAD oxidoreductase について

H. thermophilus のドラフトゲノム中に上記酵素をコードする遺伝子が見出された。そこで、遺伝子クローニングの後、大腸菌での発現系を構築し、さらに、組換えタンパク質の精製系も確立した。なお、得られた酵素は還元型フェレドキシン依存の NADH 生成活性を触媒していることが示唆された。

(8) フェレドキシンについて

H. thermophilus の代謝においてはフェレドキシンが電子伝達体として中心的な役割を担っている。そこで、フェレドキシンを軸とした網羅的研究が必要となってきた。そこでまず、ドラフトゲノム中に見出された6種類のフェレドキシン遺伝子について、大腸菌での発現系を確立した。また、フェレドキシンを担体とするアフィニティークロマトを調製し、フェレドキシンと相互作用するタンパク質を追跡。

(9) 一酸化炭素デヒドロゲナーゼ (CODH) について

タンパク質的に検出されていた CODH がドラフトゲノム上にも存在することが確認された。

中温性水素細菌 *Hydrogenovibrio marinus* の二酸化炭素応答について

3種類の RubisCO の発現をそれぞれ調節する、3種類の調節遺伝子 *cbbR1*、*cbbR2*、*cbbM* の存在を明らかにした。3種類の RubisCO 遺伝子はそれぞれの調節遺伝子産物により正に制御されていることを明らかにした。さらに、各 RubisCO 遺伝子がどのような二酸化炭素濃度で発現するかというプロファイルも得られた。

好熱性硫黄細菌 *Acidianus brierleyi* の 3-ヒドロキシプロピオン酸サイクルについて
好熱性硫黄細菌 *A. brierleyi* から 3-ヒ

ドロキシプロピオン酸サイクルの鍵酵素であるアセチル-CoA カルボキシラーゼを精製し結晶化を試みている。今までのところ結晶は得られておらず、また、大腸菌での組換えタンパク質の発現も難航している。

5. これまでの進捗状況と今後の計画
還元的 TCA サイクルの機能性解明については当初計画より進展が速い。そこで、さらに幅を持たせて研究を進展させるつもりである。一方、結晶構造解明はかなり遅れているため、研究の効率化、人的資源投入などを積極的に考慮していく。

6. これまでの発表論文等

(研究代表者は太字、研究分担者には下線)

- (1) Miho Aoshima, **Yasuo Igarashi**. J. Bacteriol., 190, 2050-2055 (2008)
- (2) Yasufumi Ueda, Masahiro Yamamoto, Takashi Urasaki, Hiroyuki Arai, **Masaharu Ishii** and **Yasuo Igarashi**. J. Biosci. Bioeng., 104, 470-475 (2007)
- (3) M. Kameya, T. Ikeda, M. Nakamura, H. Arai, M. Ishii, and **Y. Igarashi**. J. Bacteriol., 189 (7), 2805-2812 (2007)
- (4) M. Kameya, H. Arai, M. Ishii, and **Y. Igarashi**. J. Biosci. Bioeng., 102 (4), 311-315 (2006)
- (5) M. Aoshima and **Y. Igarashi**. Mol. Microbiol., 62 (3), 748-759 (2006)
- (6) M. Yamamoto, H. Arai, M. Ishii, and **Y. Igarashi**. FEMS Microbiol. Lett., 263 (2), 189-193 (2006)
- (7) T. Ikeda, T. Ochiai, S. Morita, A. Nishiyama, E. Yamada, H. Arai, M. Ishii, and **Y. Igarashi**. Biochem. Biophys. Res. Commun. 340 (1), 76-82 (2006)
- (8) K. Toyoda, Y. Yoshizawa, H. Arai, M. Ishii, and **Y. Igarashi**. Microbiology, 151, 3615-3625 (2005)
- (9) T. Ikeda, M. Yamamoto, H. Arai, M. Ishii, and **Y. Igarashi**. Biosci. Biotechnol. Biochem., 69 (6), 1172-1177 (2005)

ホームページ等

[http:// amb.bt.a.u-tokyo.ac.jp](http://amb.bt.a.u-tokyo.ac.jp)