



PRESS RELEASE

岡山大学記者クラブ

文部科学記者会

科学記者会

御中

令和 3 年 10 月 22 日

岡 山 大 学

最終普遍共通祖先 LUCA の炭素代謝経路を支配する新たな速度論的仮説 ～速度論的競合が生み出す炭素代謝経路の多様性～

◆発表のポイント

- ・還元的アセチルコエンザイム A (rACoA) 経路と還元的トリカルボン酸 (rTCA) 経路は、最終普遍共通祖先から初期に分岐した細菌・古細菌に存在する、CO₂ から有機物を作り出す最古の反応経路として知られている。
- ・炭素代謝の化学反応シミュレーションを用いて、これら二つの経路が一つの細胞内に共存すると、化学反応同士の競合により、部分的に抑制された TCA 経路が出現することを見出した。
- ・進化の過程において、このような化学反応効率の低下を回避する事を「速度論的仮説」として提案し、深部分岐細菌および古細菌において矛盾しないこと確認した。

岡山大学異分野基礎科学研究所の墨智成准教授と豊橋技術科学大学 IT 活用教育センターの原田耕治准教授は、始原的な独立栄養嫌気性好熱細菌（注 1）*Thermosulfidibacter takaii* の炭素代謝に関する反応速度論的ネットワークモデル（注 2）を開発しました。従来酸化方向にしか反応が進まないと考えられてきたクエン酸合成酵素に依存した *T. takaii* の還元的トリカルボン酸 (rTCA) 回路（注 3, 図 2）は、二酸化炭素 (CO₂) 固定反応による独立栄養成長を可能にすることを、反応速度論的シミュレーションにより実証しました。

さらに本モデルによるシミュレーションを用いて、rTCA 回路と並び最も古い CO₂ 固定経路（注 4）として知られている還元的アセチルコエンザイム A (rACoA) 経路の単一細胞内での共存が、rTCA 回路の一部のフラックスを強く抑制した新たな回路を生み出すことを実証しました。このような化学反応同士の競合による新たな炭素代謝経路の出現は、最終普遍共通祖先 (LUCA)（図 1）においても成立していた可能性が示唆されます。実際、rACoA 経路が存在し、アセチルコエンザイム A (ACoA) が rTCA 回路へ流入する独立栄養生物では、完全な rTCA 回路の代わりに還元的 TCA 部分経路あるいは酸化的 TCA 部分経路が新たな TCA 経路として出現することを、深部分岐細菌および古細菌において確認しました。

本速度論的仮説は rTCA 回路に ACoA 流入をもたらす他の CO₂ 固定経路（ジカルボキシレート/4-ヒドロキシ酪酸 (DC/4-HB) 経路, 3-ヒドロキシプロピオン酸/4-ヒドロキシ酪酸 (3-HP/4-HB) 経路, 還元的グリシン (rGly) 経路) との共存も含め一般化が可能であり、これらを有する細菌および古細菌における多様な TCA 経路の系統発生を理解する上で、今後重要な役割を果たしてゆくことが期待されます。

本研究は日本時間 10 月 22 日 18 時に、Springer Nature の化学専門誌「*Communications Chemistry*」にオンライン掲載されます。



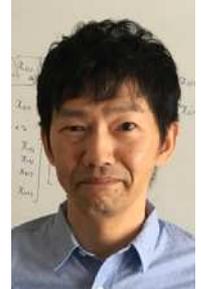
PRESS RELEASE

◆研究者からのひとこと

LUCAはrACoA経路を使ってCO₂から必要な全ての有機物を自ら合成する独立栄養生物であると推定されています。従って、炭素代謝の進化の追跡が、微生物の進化の探究に繋がってゆくはずです。まずは始原的な *T. takaii* の炭素代謝に関する反応速度論的モデルを開発し、rACoA経路が共存する場合、rTCA経路上で化学反応の部分的阻害が生じるという、以前の研究とは異なる予想外な結論が導かれました。この発見がベースとなり、炭素代謝経路同士の速度論的競合が内部選択圧になり新たな炭素代謝経路の出現を可能にするという、新たな速度論的仮説の提案に至りました。



墨准教授



原田准教授

■発表内容

<現状>

最終普遍共通祖先 LUCA (Last Universal Common Ancestor) は、その起源を約 40 億年前にまでさかのぼる単細胞生物であり (図 1)、現存する細菌および古細菌の遺伝子の分析と子孫の辿った進化の歴史を解析することで、LUCA の遺伝子が特定されています [1]。それによると LUCA は、今日でも地球上に存在する熱水噴出孔に似た環境、つまり酸素がなく非常に高温で、鉱物の豊富な極限環境において、H₂ と CO₂ から還元的アセチルコエンザイム A (rACoA) 経路 (Wood-Ljungdahl 経路とも呼ばれる) を使って化学合成独立栄養成長をしていたと推定されています [1]。一方、代謝フラックスバランス解析 (注 5) に基づく系統代謝分析からは、LUCA あるいは LUCA を導く生物学的原始システムが、rACoA 経路および還元的トリカルボン酸 (rTCA) 回路 (注 3) が共存した冗長的代謝ネットワークを持つことが、Braakman らによって提案されています [2]。

現在では、rACoA および rTCA 経路、並びに最近発見された還元的グリシン (rGly) 経路も含め、7 つもの CO₂ 固定経路が知られており [3]、これらは部分的に重複した代謝経路を共有することが明らかにされていますが、これらがどのように進化してきたのか、ほぼ未解明な状態です。

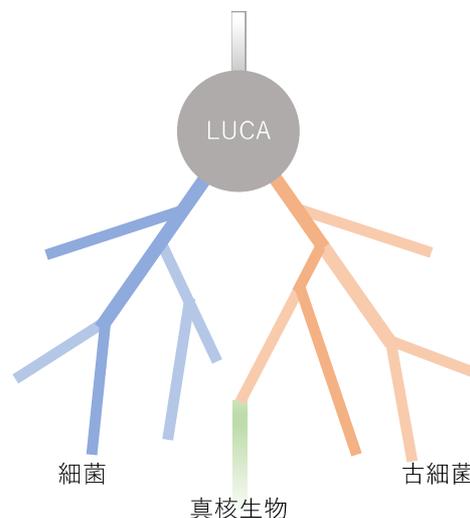


図 1. 最終普遍共通祖先 LUCA (Last Universal Common Ancestor) から分岐した細菌および古細菌並びに真核生物の模式的な系統発生図。



PRESS RELEASE

<研究成果の内容>

酸化的 TCA 回路において、クエン酸合成酵素によりアセチル CoA とオキサロ酢酸からクエン酸を合成する反応は自発的に進む反応であることが知られています。そのため、この反応を逆方向（還元方向）へ進めるには、アデノシン三リン酸（ATP）の加水分解反応とクエン酸リアーゼの働きが必須であると考えられてきました。ところが、*T. takaii* 並びに *Desulfurella acetivorans* は、従来酸化方向にしか反応が進まないと考えられてきたクエン酸合成酵素から成る TCA 経路を有しているにもかかわらず、還元的に TCA 回路を使って CO₂ 固定をしながら独立栄養成長出来ることを、二つのグループがほぼ同時に実証しました [4,5]。墨准教授および原田准教授は、この興味深い現象がどのように実現されているのか疑問を持ち、計算機シミュレーションによる解明を目指し、*T. takaii* のゲノム解析によって特定された炭素代謝に関与する酵素を考慮した反応速度論的ネットワークモデル（注2）を開発しました（図2）。そして、還元フェロドキシン（Fdx_{red}）などの強力な還元力および、逆反応の生成物（アセチル CoA およびオキサロ酢酸）の濃度を十分低下させることにより、*T. takaii* で確認されたクエン酸リアーゼによらない還元的 TCA 反応が可能であることをシミュレーション実験により実証しました（図2a）。また、酸化的 TCA 回路では必ずしも必要とされないピルビン酸カルボキシラーゼが rTCA 回路では必要不可欠であり、この酵素によるピルビン酸からオキサロ酢酸を合成する反応が、rTCA 回路を実現する上で極めて重要であることを明らかにしました。

次に我々は Braakman らが提案した rTCA 回路と rACoA 経路の共存[2]が仮に単一細胞内で実現する場合、rTCA 回路にどのような影響が現れるのか調査しました。すると予想外にも、rTCA 回路のフラックス（化学反応の流れ）は ACoA 流入との競合により、反応速度が部分的に著しく低下することが明らかとなりました（図2b）。我々はこの知見に基づき「rACoA 経路と TCA 回路が共存し、rACoA からの ACoA フラックスが TCA 回路にインプットされるとき、化学反応同士の競合による反応速度の低下を回避するため、部分的な TCA 回路が出現する」とする速度論的仮説を提案しました。

PRESS RELEASE

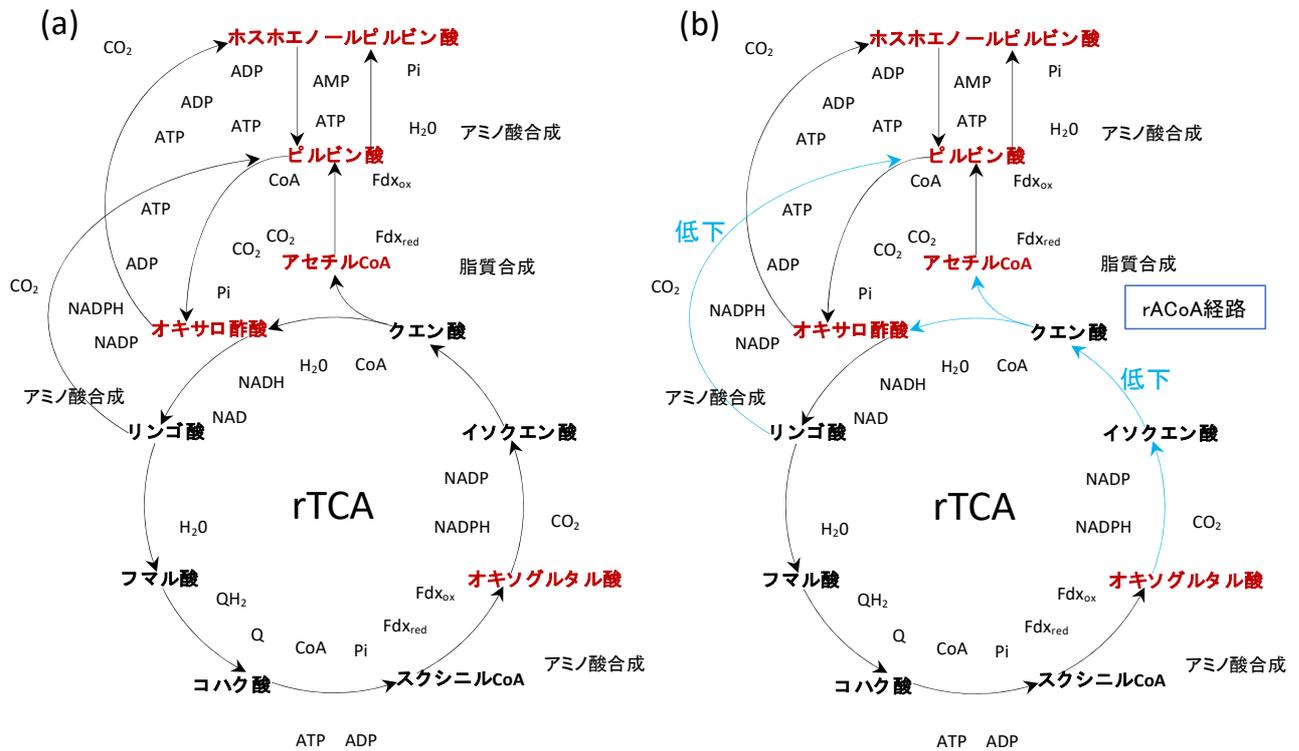


図 2. *T. takaii* に対する炭素代謝ネットワークモデルを用いたシミュレーションによって得られた定常状態における反応の流れやすさ。同化作用における 5 つの普遍的な前駆体 (赤字) は生合成反応で消費されます。(a) 独立栄養成長時の *T. takaii* における rTCA 回路における炭素代謝フラックス。(b) rACoA 経路が共存した場合を仮定した, ACoA 流入を考慮した TCA 回路フラックス。水色の矢印は ACoA 流入において生じたフラックスとの競合によって著しく低下したフラックスを示します。

次に我々はこの速度論的仮説の正しさを KEGG 遺伝子データベースに登録されている細菌, 古細菌に対して検証しました。まず我々は, KEGG 遺伝子データベースから rACoA 経路が存在し, rTCA 回路との競合が予想される細菌・古細菌類を集めたグループ (Type I) と, rACoA 経路が存在せず rTCA 回路との競合が起きないと予想される細菌・古細菌類を集めたグループ (Type II) に分類しました。そして KEGG 遺伝子データベース情報をもとに, 細菌/古細菌の炭素代謝モデルを構築し, シミュレーション実験を行いました。その結果, Type I のグループでは競合を回避した部分的 TCA 回路のみが出現し, Type II のグループでは完全な rTCA 回路が出現する事を, 以下の 1,2,3 で確認し, 速度論的仮説の正しさを実証しました。

1. Type-I に分類された細菌・古細菌のグループでは, 速度論的仮説が示唆するように完全な rTCA 回路は現れず, 部分還元的小および部分酸化的小 TCA 回路が表現型として出現することを確認しました (図 3, A1, B1, B2)。LUCA は深部分岐細菌および古細菌に共通な表現型と考えられるので, 部分還元的小 TCA (図 3, A1, B1) が LUCA の炭素代謝システムとして有力です。
2. Type-II に分類された細菌のグループでは, 速度論的仮説が示唆するように完全な rTCA 回路 (図 3, B3) が出現しました。一方, 還元的小グリシン (rGly) 経路と rTCA の共存する細菌ではシミュレーションの結果, 部分還元的小 TCA 回路 (図 3, B4) が現れました。この場合, rACoA 経路はないですが, rGly 経路から ACoA 流入があるため, 化学反応同士の競合が起こり, 部分還元



PRESS RELEASE

的 TCA 回路が現れたと考えられます。カルビン回路 (Calvin-Benson-Bassham (CBB) 回路) が共存する場合は、酸化的 TCA 回路 (図 3, B5) が化学反応同士の競合による効率低下を回避する表現型として出現します。

3. Type-II に分類された古細菌のグループでは、速度論的仮説が示唆するように完全な酸化的 TCA 回路 (図 3, A2) が出現しました。一方、CO₂ 固定経路であるジカルボキシレート/4-ヒドロキシ酪酸 (DC/4-HB) 経路あるいは 3-ヒドロキシプロピオン酸/4-ヒドロキシ酪酸 (3-HP/4-HB) 経路が共存する古細菌では、rACoA 経路以外から ACoA 流入があるため rTCA 回路上に著しい反応速度の低下が現れると予想されますが、実際には、rTCA フラックスは DC/4-HB または 3-HP/4-HB 経路を迂回するので、同化反応の低下に至りません (図 3, A3)。この古細菌は、従属栄養成長条件下において酸化的に TCA 回路を利用しながら効率的なエネルギー生産を実現するため、独立栄養成長条件下において活性が低い rTCA 回路上の酵素を維持するという選択圧が働いていると考えられます。

<社会的な意義>

TCA 回路は生物界に幅広く存在する普遍的な代謝経路であり、始原的な細菌や古細菌では部分的な TCA 経路も含め同化および異化の可逆的柔軟性を有しており、真核生物ではミトコンドリアによる効率的な ATP 産生に関与しています。本研究で見出された「化学反応同士の競合による新たな炭素代謝経路の出現」という考え方は、ゲノム情報によって特定される酵素と観測される微生物のライフスタイルとを組み合わせることにより、他の代謝経路との共存に応じた TCA 経路の多様性を統一的に説明することを可能にしました。最近代謝フラックス予測に幅広く使われるようになった、フラックスバランス解析は各酵素反応に対する複雑な反応速度論式の決定を回避できる方法として注目を集めています。しかしながら本研究から導かれた反応速度論に基づく結論は、フラックスバランス解析に基づく系統代謝分析による予測 [2] とは異なるものでした。今後、システム生物学に基づく代謝デザイン等においても、反応速度論的アプローチの重要性が再認識されると共に、バイオテクノロジーにおける新たな展開にも貢献してゆくことが期待されます。

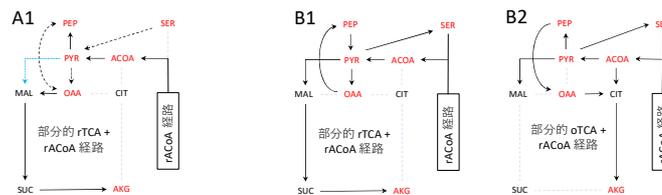


LUCA

Type-I 進化過程

古細菌

細菌



Type-II 進化過程

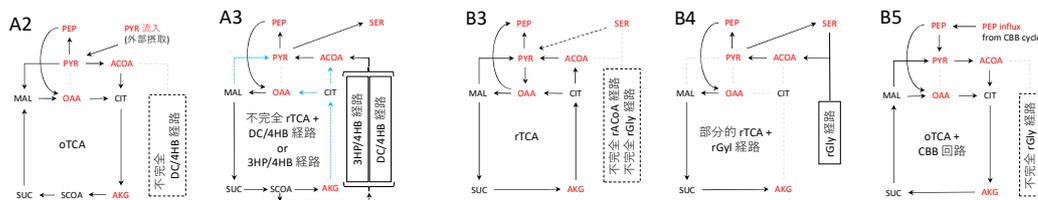


図 3. 深部分岐細菌および古細菌における炭素代謝経路の進化過程。Type-I および Type-II 進化過程はそれぞれ、rAcCoA 経路が共存する場合および共存しない場合に対応し、それぞれにおいて出現する進化過程モデルを示しています。

■参考文献

1. Weiss MC, Sousa FL, Mrnjavac N, Neukirchen S, Roettger M, Nelson-Sathi S, et al. The physiology and habitat of the last universal common ancestor. *Nat Microbiol.* Nature Publishing Group; 2016;1: 16116–8. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.116
2. Braakman R, Smith E. The Emergence and Early Evolution of Biological Carbon-Fixation. *PLoS Comput Biol.* Public Library of Science; 2012;8. doi:10.1371/journal.pcbi.1002455
3. Sánchez-Andrea I, Guedes IA, Hornung B, Boeren S, Lawson CE, Sousa DZ, et al. The reductive glycine pathway allows autotrophic growth of *Desulfovibrio desulfuricans*. *Nature Communications.* Nature Publishing Group; 2020;11: 5090–12. doi:10.1038/s41467-020-18906-7
4. Nunoura T, Chikaraishi Y, Izaki R, Suwa T, Sato T, Harada T, et al. A primordial and reversible TCA cycle in a facultatively chemolithoautotrophic thermophile. *Science.* 2018;359: 559–563. doi:10.1126/science.aao3407
5. Mall A, Sobotta J, Huber C, Tschirner C, Kowarschik S, Bačnik K, et al. Reversibility of citrate synthase allows autotrophic growth of a thermophilic bacterium. *Science.* American Association for the Advancement of Science; 2018;359: 563–567. doi:10.1126/science.aao2410



PRESS RELEASE

■論文情報等

論文名： Kinetics of the ancestral carbon metabolism pathways in deep-branching bacteria and archaea

掲載誌： *Communications Chemistry*

著者： Tomonari Sumi, Kouji Harada

DOI： 10.1038/s42004-021-00585-0

発表論文はこちらからご確認いただけます。

URL： <https://doi.org/10.1038/s42004-021-00585-0>

■研究資金

本研究は、独立行政法人日本学術振興会 (JSPS) 科学研究費補助金 (JP20K05431) の助成を受け実施しました。

■補足・用語説明

注 1：独立栄養嫌気性好熱細菌

独立栄養生物とは CO₂ などの無機化合物のみを炭素源として、無機化合物または光をエネルギー源として成長する生物です。嫌気性生物は、増殖に酸素を必要としない生物であるので、本研究で研究対象とした独立栄養嫌気性好熱細菌 *Thermosulfidibacter takaii* は、酸素を必要とせず、高温環境下（生育限界温度が 55°C 以上）で CO₂ を炭素源として生育する細菌です。超好熱かつ嫌気的環境は生命誕生当初の地球に似ていることから、独立栄養嫌気性好熱菌は原始生物に近いと考えられています。実際、最終普遍共通祖先 LUCA も同様なライフスタイルを持つと推定されています。

注 2：反応速度論的ネットワークモデル

本研究では、*T. takaii* のゲノム解析によって特定された酵素に対して、生化学実験により報告されている反応速度の反応物および生成物濃度依存性を定量的に再現する反応速度モデルを構築し、それらを考慮して炭素代謝で生じる化学反応回路をシミュレートするための「反応速度論的ネットワークモデル」を開発しました。本モデルでは、少なくとも各酵素反応における平衡定数が考慮されているため、反応物と生成物の濃度に応じた可逆的な化学反応を再現でき、反応ギブスエネルギーによって規定される反応方向と矛盾しない化学反応フラックスを与えるのが特筆すべき点で、この特性は、注 5 の「代謝フラックスバランス解析」と質的に異なる利点の一つとして挙げられます。

注 3：還元的トリカルボン酸 (rTCA) 回路

トリカルボン酸 (TCA) 回路は高等学校の生物学の教科書ではクエン酸回路と呼ばれており、酸素呼吸を行う生物全般に見られる好氣的代謝で最も重要な生化学反応回路です。解糖系におけるグルコースの異化によるエネルギー産生反応の生成物として与えられるピルビン酸が TCA 回路に組み込まれると、酸化方向への反応により、極めて効率の良いエネルギー生産が行われます。一方、有機物を炭素源として用いない一部の独立栄養生物も TCA 回路を所有し、この回路でエネルギー物質



PRESS RELEASE

を消費しながら CO₂ を有機物へ取り込む炭素固定を行うことができます。この同化反応を行う TCA 回路を、還元的トリカルボン酸 (rTCA) 回路と呼びます (図 2)。

注 4 : CO₂ 固定経路

CO₂ 固定とは、CO₂ として存在する炭素を、エネルギーを消費しながら有機物質の形に変換して、生体内に取り込む過程のこと。現在、CO₂ 固定を行う 7 つの経路の存在が知られている。

注 5 : 代謝フラックスバランス解析

ゲノム解析に基づく代謝ネットワークの情報から、代謝フラックスを定量的に予測する方法で、注 2 の反応速度論的モデリングと異なり、生化学実験によって与えられる反応速度論的データに基づく反応速度式の決定を回避することが可能となります。生化学の分野では、酵素反応に対する反応速度式の決定は、それだけでも一つの論文として研究成果を発表することもある大変な仕事です。一方、代謝フラックスバランス解析と呼ばれる方法では、「代謝フラックスは定常である」という仮定を課すことにより、この煩雑な作業を回避し、モデル内の全ての代謝物質を生成するフラックスと消費するフラックスがバランスした状態を探索することができます。しかしながら、代謝フラックスを一意的に決定するためには、例えば「細胞増殖速度を最大化する」などの付加条件をさらに加える必要があり、それにより観測されている代謝状態を定量的に予測できる場合があることが、これまでの研究で示されています。

<お問い合わせ>

岡山大学異分野基礎科学研究所
准教授 墨 智成 (すみ ともなり)
(電話番号) 086-251-7837



岡山大学は持続可能な開発目標 (SDGs) を支援しています。