

生物炭酸固定と生物工学

石井 正治

生物炭酸固定の重要性

これまでに知られている地球上のすべての生物は、炭素代謝をその骨格として有している。それ故、炭素が関わる生物的代謝経路は、生命の来し方を、明にあるいは暗に示すものとなっている。

生物をその炭素代謝システムにより分類すると、生体を構成するすべての炭素成分を炭酸ガスから生合成できる生物群は独立栄養生物と総称され、そうではない生物群は従属栄養生物と呼ばれる。アセチル-CoA カルボキシラーゼ反応やピルビン酸カルボキシラーゼ反応など、従属栄養生物にも炭酸ガスを固定する酵素反応はいくつも散見されるものの、独立栄養生物に備わっているような、完全な炭酸固定経路が存在してはいないため、従属栄養生物は常に他の生物由来の有機炭素成分を取り込み続ける必要がある。こうした生物活動の内、目に見えるものは食物連鎖として表現されることもあるが、根源的に生じている事柄は、独立栄養生物が固定した炭酸ガスの、他種生物による収奪である。換言すれば、地球上の生物の存在を根本から支えているのは、独立栄養生物の炭酸固定代謝となっている。

独立栄養生物の代謝が重要であることは代謝機能的に充分理解可能であるが、進化の面からはいかがであろうか。すなわち、初期生物の代謝は独立栄養的なものであったのだろうか、それとも従属栄養的なものであったのだろうか。

本稿では、こうした背景や疑問をもとに、独立栄養生物の炭酸固定代謝を概観し、生物炭酸固定を生物工学的に斬ることを試みてみたい。

独立栄養的生物炭酸固定経路の概要

これまでに6種類の独立栄養的炭酸固定経路が知られている¹⁾。糖代謝系を基盤とするものが1種類（カルビン-ベンソンサイクル）、C1化合物代謝を基盤とするものが1種類（アセチル-CoA 経路：図1）、有機酸代謝を基盤とするものが4種類（3-ヒドロキシプロピオン酸サイクル、3-ヒドロキシプロピオン酸/4-ヒドロキシ酪酸

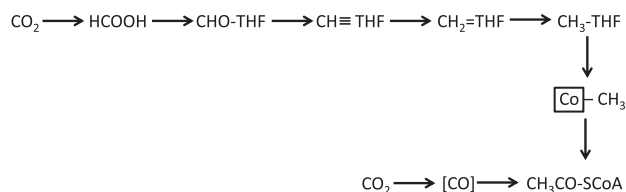


図1. アセチル-CoA 経路の模式図。THFはテトラヒドロ葉酸を、 $\boxed{\text{Co}}$ はコリノイドタンパク質を表している。

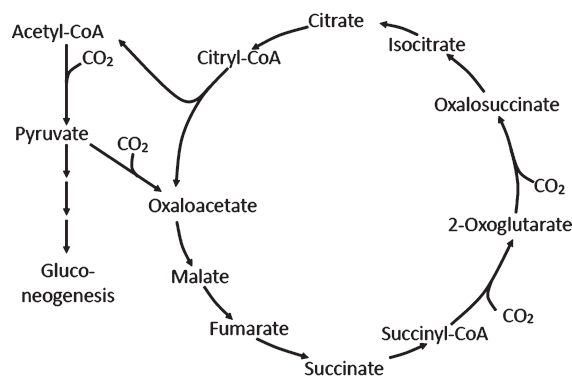


図2. 還元的TCAサイクルの模式図

サイクル、ジカルボキシル酸/4-ヒドロキシ酪酸サイクル、還元的TCAサイクル（図2）である。表1は、どのような生物種でそれぞれの経路が機能しているかを纏めたものである。

上記炭酸固定経路の内、3-ヒドロキシプロピオン酸サイクル、3-ヒドロキシプロピオン酸/4-ヒドロキシ酪酸サイクル、そして、ジカルボキシル酸/4-ヒドロキシ酪酸サイクルは、ごく最近発見されたものである。これらは、酵素活性測定技術、トレーサー実験技術などに裏打ちされた研究進捗の成果と言えよう。一方では、今後も新たな独立栄養的炭酸固定経路の発見はまだまだ続くものと推測され、微生物代謝研究においては、ホットな分野となっている。

以下、アセチル-CoA 経路と還元的TCAサイクルについて多少コメントする。

表1. 炭酸固定経路と生物

独立栄養的炭酸固定経路	当該炭酸固定経路が機能している生物
カルビン-ベンソンサイクル	ラン藻, プロテオバクテリア, 藻類, 植物
アセチル-CoA経路	グラム陽性菌, プロテオバクテリア, プラントミセス, ユーリアーキオータ
3-ヒドロキシプロピオン酸サイクル	緑色非硫黄細菌
3-ヒドロキシプロピオン酸/4-ヒドロキシ酪酸サイクル	クレーンアーキオータとユーリアーキオータ
ジカルボキシル酸/4-ヒドロキシ酪酸サイクル	クレーンアーキオータ
還元的TCAサイクル	プロテオバクテリア, 緑色硫黄細菌, アクイフェックス・ハイドロジェノバクター, クレーンアーキオータ

まず、アセチル-CoA経路であるが、6種類の経路の中で、これだけが一方通行の経路となっていることは大きな特徴と言えよう。生物が代謝系を創出しつつある時、出来上がるものが回路を形成することは極めて稀で、一方通行的なものがまず出来上がるであろうことはごく自然な成り行きと思われる。こうした中、Russellらはアセチル-CoA経路がおそらく最初の代謝系であったであろうことを述べている興味深い論文を提示している²⁾。

還元的TCAサイクルは、その接頭辞の存在から、TCAサイクルがまずあったことを匂わすような文字列から成っているが、実際には、還元的TCAサイクルが先で、TCAサイクルはその後で機能するようになったのだらうと筆者は感じている。

第一の状況証拠は、進化系統的なものである。すなわち、独立栄養的炭酸固定能を有する*Hydrogenobacter thermophilus*は、16S rRNAの塩基配列から、進化系統的に古い起源を有するバクテリアであることが示されているが、本菌は還元的TCAサイクルにより炭酸固定を行い、必要とされる各種アミノ酸の骨格を同化的に供給している³⁾。

第二の状況証拠は、炭素が関わる生物学的代謝は、生命の来し方を、明にあるいは暗に示すものとなっている、という冒頭の筆者の考えに基づいたものである。生物の代謝系では、時として、同じ触媒様式を有する反応が同じ順番で生じていることがある⁴⁾。このような事柄は、その代謝系の歴史を物語っている場合もあると筆者は考えている。実際、還元的TCAサイクルを良く観察して見ると、そのようなことが起こっていることが分かる。

以下、筆者の推測も織り交ぜて記述する。

アセチル-CoA経路により供給されるアセチル-CoAを生物はさらに代謝し、ピルビン酸、オキザロ酢酸、リ

ンゴ酸、フマル酸、コハク酸を生成していった。この間の酵素反応を概観すると、アセチル-CoAとピルビン酸間はフェレドキシン依存の炭酸固定反応、ピルビン酸とオキザロ酢酸間はビオチン依存の炭酸固定反応、オキザロ酢酸とリンゴ酸間は還元反応、リンゴ酸とフマル酸間は脱水反応、フマル酸とコハク酸間は還元反応となっている。コハク酸がさらに代謝されるべくスクシニル-CoAが生成した後、スクシニル-CoAはフェレドキシン依存の炭酸固定反応により2-オキソグルタル酸に、2-オキソグルタル酸はビオチン依存の炭酸固定反応によりオキザロコハク酸に、オキザロコハク酸は還元反応によりイソクエン酸に、イソクエン酸は脱水並びに水和反応によりクエン酸へと代謝されている。このようにして、アセチル-CoAから還元的TCAサイクルの代謝を辿ってみると、あたかもサクセスストーリーをそのまま踏襲しているかのように、同じ機能を有した酵素反応が同じ順番で使われていることが分かる。一方で、逆に辿ると、即ちTCAサイクルに沿って見ると、このようなことにはなっていない。

読者諸氏には、還元的TCAサイクルの側から見ても完全には順番は一致していない、と言われる向きがあるかもしれない。実際、前半部分では脱水反応（リンゴ酸とフマル酸間）の後、還元反応（フマル酸とコハク酸間）が起こっているが、後半部分では脱水水和反応だけで足りており、還元反応は使われていない。

おそらく、生物はフマル酸の分子対象性を打破するべく還元反応を用意してはいたものの、後半部分では脱水反応に引き続き水和反応が同じ酵素反応(アコニターゼ)により生じクエン酸が生成した。この時点で還元反応の出る幕はなくなり、それに代わりクエン酸は解裂反応を受け、アセチル-CoAとオキザロ酢酸に変換され、サイ

クルが完結したのではないかと考えている。なお、「フマル酸の分子対象性を打破するべく還元反応を用意した」ことを裏打ちする事実として以下が挙げられよう。すなわち、上述した *Hydrogenobacter thermophilus* においては、フマル酸とコハク酸間の代謝は、フマル酸還元酵素により触媒されているが、この酵素タンパク質中には極めて多くの酸化還元補因子が存在、あるいはそれらを保持できるモチーフがある⁵⁾。この事実の発見当初は、それぞれのモチーフに意味があるものと考えていたが、最近では、フマル酸を代謝するために同菌株があがき続けた最終形的な存在が、現在の酵素タンパク質となっているのでは、と推測している。

さて、アセチル-CoA経路と還元的TCAサイクルの機能性発動の進化的前後性について、読者諸氏はまた疑問を投げかけるものと推測する。上述の *Hydrogenobacter* では、ゲノム解析が終了しているので、少なくとも遺伝子セットのあるなしについては議論できる。すなわち、本菌には、アセチル-CoA経路の多くの

遺伝子が存在していることが分かっている。これが意味するところは、今後生理生化学的に追求されるべきポイントであるが、還元的TCAサイクルが機能し始めたため、代謝的に非効率な部分がゲノムからも取り除かれていった、と考えると納得できるように思える。

さて、本稿では独立栄養的炭酸固定が主題ではあるが、メチロトロフの2種類の経路（グリオキシル酸経路を内在させているセリン経路とエチルマロニル-CoA経路を内在させているセリン経路）も、サイクリックに炭酸ガスを固定している経路と見做すこともできるため、将来的に生物工学的な研究課題になる可能性もあると、筆者は考えている⁶⁾。

独立栄養的炭酸固定経路を構成する 炭酸固定酵素（反応）について

独立栄養的炭酸固定経路を構成する炭酸固定酵素と、経路名とを表2に示す。アセチル-CoA経路においては、ギ酸デヒドロゲナーゼと一酸化炭素デヒドロゲナーゼと

表2. 炭酸固定酵素と炭酸固定経路

炭酸固定酵素	当該炭酸固定酵素が関わっている炭酸固定経路
RubisCO	カルビン-ベンソンサイクル
アセチル-CoAカルボキシラーゼ	3-ヒドロキシプロピオン酸サイクル, 3-ヒドロキシプロピオン酸/4-ヒドロキシ酪酸サイクル
プロピオニル-CoAカルボキシラーゼ	3-ヒドロキシプロピオン酸サイクル, 3-ヒドロキシプロピオン酸/4-ヒドロキシ酪酸サイクル
ピルビン酸:フェレドキシン酸化還元酵素	ジカルボキシル酸/4-ヒドロキシ酪酸サイクル, 還元的TCAサイクル
ピルビン酸(ホスホエノールピルビン酸)カルボキシラーゼ	ジカルボキシル酸/4-ヒドロキシ酪酸サイクル, 還元的TCAサイクル
2-オキソグルタル酸:フェレドキシン酸化還元酵素	還元的TCAサイクル
2-オキソグルタル酸カルボキシラーゼ	還元的TCAサイクル

表3. 炭酸固定酵素と活性中心補酵素

炭酸固定酵素	活性中心補酵素
RubisCO	NA
アセチル-CoAカルボキシラーゼ	ビオチン
プロピオニル-CoAカルボキシラーゼ	ビオチン
ピルビン酸:フェレドキシン酸化還元酵素	チアミンピロリン酸
ピルビン酸カルボキシラーゼ	ビオチン
ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ	NA
2-オキソグルタル酸:フェレドキシン酸化還元酵素	チアミンピロリン酸
2-オキソグルタル酸カルボキシラーゼ	ビオチン

NA: Not applicable

が炭酸ガスの還元を担ってはいるものの、C-C結合を形成するという狭義の炭酸固定反応を触媒しているとはみなせないため、この表からは除外している。同様に、アセチル-CoAシンターゼはC-C結合を形成はするものの、炭酸ガスを固定しているとはみなせないため、やはり除外している。表から、高々7種類の、除外した2種類を入れ込んだとしても9種類の、酵素が生物的炭酸固定を担っていることが読み取れる。

酵素の活性中心の補因子についてまとめたものを表3に示す。酵素の種類よりもさらに多様性は狭まり、ピオチンとチアミンピロリン酸が主要な補因子であることが分かる。RubisCOとホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼには補因子が存在してはいないものの、炭酸固定機構的に反応を見ると、全ての炭酸固定反応は、基質の電子リッチな反応部位が炭酸ガスと反応するというものであることが分かる。

生物炭酸固定（反応）と生物工学

～今後の研究課題についての浅学者の提案～

生物工学を「生物を工学的に解析し、その成果をさらなる工学的変化に生かす」と読み取るのであれば、炭酸固定反応としての一般性を有しているという意味において、生物炭酸固定反応において対象とすべきはピオチンとチアミンピロリン酸を補因子とする反応であろうと考えている。もちろん、RubisCOを対象とする研究は、それ自体大きな意味を持っていることについて、筆者は全面的に賛同するが、あえてここではRubisCOは外して考えていく。

ピオチンを補因子に有する酵素については、以下のような研究展開が可能であろう。

- (1) 構造化学的研究により、カルボキシトランスフェラーゼの基質特異性を広げる。
- (2) 既存のカルボキシトランスフェラーゼそのものを利用し、その構造化学的研究基盤から、可能性のある他の基質を創出したり、見いだす。

チアミンピロリン酸を補因子に有するタイプの炭素固定酵素は、強力な還元力（たとえば還元的フェレドキシン）からの電子を受け取る部位、酵素内での電子伝達部位、さらにTPPを有する活性中心部位から成っている。そのため、電子の出入りの部分を対象にして、人為的な改変を通じた以下のような研究展開が可能であろう。す

なわち、

- (1) フェレドキシンと酵素間での電子伝達をより効率化させる。
- (2) TPPと基質との反応性を効率化させる。
- (3) 反応産物が酵素とより離れやすくなるようにする。

以上のような戦略により、より効率化された酵素を創出することが可能となり、効率化酵素を今一度元の生物に戻す技術を別途開発することにより、炭酸固定の効率化が可能となろう。

さて、生物炭酸固定の利用を考える場合、エネルギー源を何にするかは大きな課題となってくる。筆者は、光あるいは水素ガスが適切であろうと考えている。還元力を生成する、という意味合いにおいては、光はすぐれたエネルギー源である。なぜなら、光化学系IIのおかげで、もっとも酸化還元電位が低い生体物質の一つであるフェレドキシンも十分に還元され得るからである。ただし、エネルギーの供給を集約するという点では、太陽光を中心とした光には問題点はある。一方、水素ガスは、エネルギー供給の集約性という点では優れているものの、エネルギー準位的には酸化還元電位の低いフェレドキシンを直接には還元できない、という欠点がある。しかしながら、生物は、キノンやフラビン化合物の特異な反応性を巧みに利用し、エレクトロンバイファーケーションと総称されるエネルギー変換方法を編み出している⁷⁾。これにより、水素由来の電子を低酸化還元電位のフェレドキシンと高酸化還元電位の適切な物質とに振り分けることで、結果的にフェレドキシン還元を可能にしている。エネルギー準位の逆転を見かけ上可能にしているという点において、エレクトロンバイファーケーション研究を生物物理化学的に推進していくことは、今後多方面から脚光を浴びる重要な事柄となってくるであろう。

果たして水素ガスを利用できる（微）生物が、水に溶け込んだ水素ガス（溶存水素）を使っているのか、あるいはガス状の水素を利用しているのかは、未解明ではあるものの、供給するガスの物理的な大きさをできる限り小さくすることは、単位体積当たりの表面積を大きくするという意味合いでも、酵素に接触する水素分子の頻度を高めるという理由においても、有意義であろう。そうしたことから、筆者は、水素ガスに限らず、ガス利用性生物へのガス供給方法は、これまで以上の検討が必要であろうと考えている。実際、立命館大学の今中教授らの

グループは「超微細気泡」を発表しており、今後の研究展開が期待される⁸⁾。

生物炭酸固定にはもう一つ広大な未開拓分野が残されている。それは、炭酸固定経路そのもののエンジニアリングである。筆者が考える戦略は以下の通りである。すなわち、これまでの生化学的知見を統合的に解析し、代謝的に無理のない経路をデザインする。しかる後に、適切な宿主を用いてそうした代謝経路を発現させ、デザインされた炭酸固定経路を機能させる。まずは、従属栄養的条件下における炭酸固定経路の機能性を対象として研究を進捗させることとなろうが、将来的には、適切な宿主に、独立栄養性をも付与することが重要になってこよう。そうしたことを狙った場合、エネルギー源として光を選ぶか、水素に向かっていくか、の2通りの選択があろう。

あるいは、研究を別の方面から進展させることも可能ではある。すなわち、従属栄養性細菌に、独立栄養的生育に必要なエネルギー獲得系を付与した後、炭酸固定経路を機能させる、というものである。この場合では、炭酸固定経路は必ずしもデザインされたものである必要

はないのかもしれない。

「生物炭酸固定」＝「独立栄養生物」と狭く捉えるのではなく、資源としての炭酸ガスを有効利用する手段として、独立栄養的な炭素代謝並びにエネルギー代謝を広範に研究することが、今後ますます重要となってこよう。

本稿で述べた事柄の一部は筆者らがALCA（独立栄養生物の代謝高性能化による低炭素化）によりサポートを受けているものであり、ここに明記する。

文 献

- 1) Fuchs, G.: *Annu. Rev. Microbiol.*, **65**, 631 (2011).
- 2) Russell, M. J. and Martin, W.: *Trends Biochem. Sci.*, **29**, 358 (2004).
- 3) Kameya, M. *et al.*: *FEBS J.*, **277**, 1876 (2010).
- 4) Nishida, H. *et al.*: *Genome Res.*, **9**, 1175 (1999).
- 5) Miura, A. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **190**, 7170 (2008).
- 6) Peyraud, R. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 4846 (2009).
- 7) Nitschke, W. and Russell, M. J.: *Bioessays*, DOI: 10.1002/bies.201100134 (in press)
- 8) <http://www.ritsumeai.ac.jp/lifescience/skbiot/imanaka/HPindex.html>