

解説

アミノ酸生合成と CO₂ 固定経路の密接な関係

グリーンバイオケミストリーから生命進化まで

Close relationship between amino acid biosynthesis and CO₂ fixation

From green biochemistry to evolution of life

千葉洋子 (CHIBA Yoko)

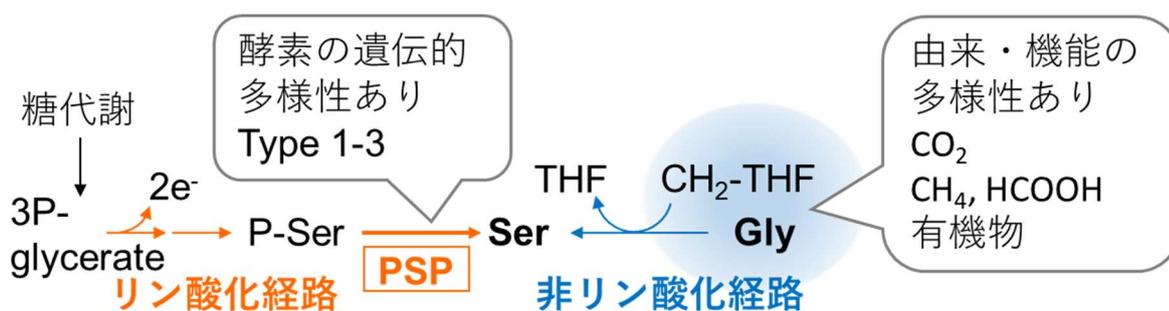
理化学研究所 環境資源科学研究センター yoko.chiba.ey@riken.jp

要旨

セリン生合成経路は炭酸固定経路および有用物質生産のプラットフォームとして注目されている。多様なセリン生合成経路について最新の知見を紹介するとともに、生物工学的・進化的な重要性についても紹介する。

Abstract

Serine biosynthesis has been attracting attention as a carbon fixation pathway and a platform for material production. I will introduce the latest knowledges on the biotechnological and evolutionary importance of serine biosynthetic pathways.



キーワード

アミノ酸生合成、炭酸固定、有用物質生産、グリーンケミストリー、代謝進化

※本文の最後に、高校生、大学1~2年生向けの【コラム】があります。

This is the submitted postprint of the following article:

Copyright © 2021 公益社団法人 日本農芸化学会 <https://katosei.jsbba.or.jp/>

DOI number: <http://doi.org/10.1271/kagakutoseibutsu.59.458>

はじめに

著者はこれまで微生物の有する新規セリン生合成酵素を発見し、セリン生合成経路を特定してきた⁽¹⁾。アミノ酸は生命の誕生と存続に不可欠である。中でも、セリンおよびそれと密接な関係にあるグリシンの代謝経路は、C1化合物(CO₂やメタンなど、炭素1個からなる化合物を意味する)の固定経路と直接つながっている点で興味深い。現存生物におけるセリン生合成経路およびC1代謝経路の多様性と生物間分布を知ることは、初期生命の代謝予測に必須である。加えて、C1代謝は持続可能な社会における物質生産のプラットフォームとしても注目されている。本稿ではC1代謝の最新の知見を紹介しつつ、セリン生合成経路解明の重要性を解説したい。

1. 古典的なセリン生合成経路

多くの生物において、セリンは解糖系・糖新生系の間産物である3-phosphoglycerateから3ステップの酵素反応を経て作られる(図1A)。本経路は、リン酸化された基質が使われることから「リン酸化経路」、もしくは最初の反応が酸化反応で

あることから「酸化経路」と呼ばれている。

一方、グリシンと5,10-CH₂-テトラヒドロ葉酸(以下CH₂-THFと略す)からセリンを作る生物もあり、この経路は「非リン酸化経路」と呼ばれている(図1A)。CH₂-THFの供給反応のひとつに、グリシンをCO₂とアンモニア、そしてCH₂-THFに分解するグリシン開裂系が挙げられる。本反応系を用いれば、グリシン2子からからセリンを作ることができる。また、メタノール(CH₃OH)など還元的C1化合物を炭素源とするメチロトロフの一部は、非リン酸化経路をC1固定経路として使っている。すなわち、細胞内に取り込んだメタノールやギ酸(HCOOH)の炭素をCH₂-THFを介してセリンとして固定する(セリン経路, 図1B)。

2. 還元的グリシン経路—第7のCO₂固定経路の発見

グリシン開裂反応は熱力学的に平衡に近い反応であり、また酵素学的にも可逆であることから、CO₂とNH₃、そしてCH₂-THFからグリシンを作ることが理論的に可能である。実際、グリシン開裂系の逆反応(=還元方向の反応)により細胞内

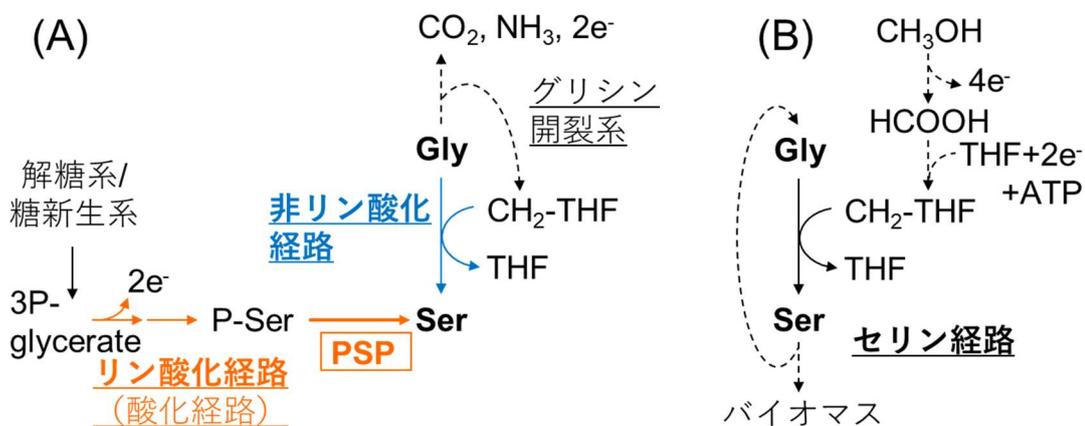


図1: (A)セリン生合成経路と(B)非リン酸化経路を用いたC1化合物固定(セリン経路) 破線は複数の酵素反応をまとめたことを意味する。PSP: phosphoserine phosphatase, P-Ser: phosphoserine, THF: tetrahydrofolate.

でグリシンが作られる現象は 1970 年代から知られていた。ただし本現象は従属栄養生物のみにて認知されており，主要な炭酸固定経路としてはみなされていなかった⁽²⁾。しかし 2020 年，本経路が独立栄養性細菌（8 プロテオバクテリアに属する *Desulfovibrio desulfuricans*）の炭酸固定経路として機能していることが証明された⁽³⁾（図 2 左）。すなわち，2 分子の CO₂（そのうち 1 分子の CO₂ はギ酸を通じて CH₂-THF に還元される）と NH₃ と結合させてグリシンを作る還元的グリシン経路が本菌の炭酸固定経路として機能していることが，多角的なオミックス解析によって示された。これは第 7 の CO₂ 固定経路であり「還元的グリシン経路」と呼ばれている。

3. 有用物質生産のプラットフォームとしての還元的グリシン経路

究極の循環型社会を作るためには，化石燃料に頼らず CO₂ と再生可能エネルギーを用いて有機物を合成する必要がある⁽⁴⁾。生物を用いた物質生産においては，CO₂ と水素や光などの再生可能エネルギーを生物に与えて直接 CO₂ を固定させる方法と，CO₂ にエネルギーを加えて還元的 C1 化合物に変換した後，これを炭素源として生物に与える方法が考えられる。後者の場合，還元的 C1 化合物の中でもギ酸とメタノールが特に注目されている。なぜならこれらは水に溶けやすく，ガスである CO₂ と比較して輸送が容易だからである。このような背景のもと，以下に詳述するように，易水溶性 C1 化合物を用いた物質生産のプラットフォームとして，ギ酸もしくはメタノールを炭素源として増殖可能な大腸菌が作られた⁽⁵⁾（図 2B）。なお，ギ酸をピルビン酸に変換する複数の経路の中から，

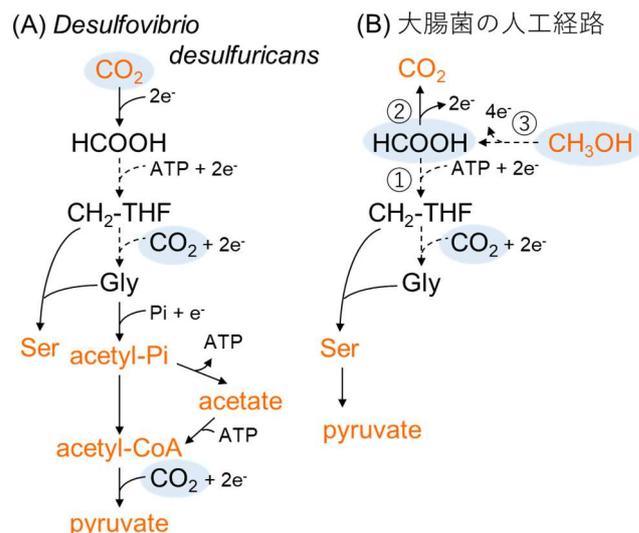


図 2 : *D. desulfuricans* (A) と大腸菌(B)の還元的グリシン経路の比較

D. desulfuricans が水素を還元力とするのに対し，大腸菌はギ酸・メタノールを還元力とする。両者の代謝で異なる部分をオレンジで記し，添加した炭素源を水色の枠で囲った。

ATP の消費が少なく，かつ酵素の酸素耐性が高いという理由で還元的グリシン経路が選ばれた。

既存の経路でセリン・グリシンを生合成できないように遺伝子改変した大腸菌に対し，還元的グリシン経路の酵素遺伝子群の中で大腸菌が有さないもの，すなわちギ酸から CH₂-THF を作る経路の酵素群を導入した（図 2 ①のの反応群）^{注1}。加えて，ギ酸脱水素酵素（HCOOH + NAD⁺ → CO₂ + NADH）遺伝子も組み込んだ（図 2 ②）。これによりギ酸は炭素源に加えてエネルギー源としても利用可能になった。そして実験室進化を経て，ギ酸 100 mM および気層の 10% の CO₂ 存在下で倍加時間 8 時間以下，最終菌密度 OD₆₀₀ 1 以上で増殖する株が得られた。さらに，メタノールデヒドロゲナーゼを導入することによりメタノールを資化可能な大腸菌も作られた（図 2 ③）。なお，メタノールを用いて培養したときの倍加速度，最終菌密度はギ酸培養条件に劣る。

注1 遺伝子源としては，全て *Methylobacterium*

extorquens (セリン経路を有するメチロトロフである)由来のものを用いた。なお大腸菌はグリシンをセリン経由でピルビン酸に変換する酵素遺伝子群を有しているが、これらも削除し *M. extorquens*由来の酵素遺伝子群を発現させている。

4. 還元的グリシン経路の比較

D. desulfuricans における還元的グリシン経路の発見と還元的グリシン経路を導入した大腸菌の作製はほぼ同時に発表されており、かつ両方の論文に共通する著者がいることから、本大腸菌の代謝デザインに *D. desulfuricans* の代謝経路が影響を与えた可能性は高い。しかし、両生物の代謝は還元的グリシン経路、すなわち CO_2 とギ酸由来の $\text{CH}_2\text{-THF}$ をグリシンとして固定する直線的な経路という基本骨格を共にする一方で、以下に示す違いがある (図 2, オレンジでハイライトした部分)。

まず, *D. desulfuricans* は水素由来のエネルギーを用いて CO_2 をギ酸に還元することが可能であり, CO_2 を唯一の炭素源として増殖できる。一方, 上述の大腸菌はギ酸を炭素源だけでなくエネルギー源 (還元力) としても用いるため, CO_2 からはギ酸を生成できない。また, C1 化合物をグリシンに固定した後の流れにも差異がある。本人工大腸菌はグリシンからセリンを経て作られたピルビン酸, すなわち C3 化合物を様々な生合成経路の主な出発物質として用いる。これに対し, *D. desulfuricans* はセリン生合成とは別の経路, すなわちグリシンをアセチル CoA (C2 化合物) に変換し, このアセチル CoA およびアセチル CoA 由来のピルビン酸を主な出発物質としてバイオマスを作る。グリシンからピルビン酸に至る経路の違い

が代謝全体にどのような影響をおよぼすのか, 今後の研究が俟たれる。なお, 自然界に存在する還元的グリシン経路保有微生物の中にも, グリシン由来のアセチル CoA ではなくセリン由来のピルビン酸を主要な生合成出発物質とするものがあるのではないかとゲノム情報から推定されている⁽²⁾。

5. 最古の CO_2 固定経路はどれか? 還元的グリシン経路と他の炭酸固定経路の比較

還元的グリシン経路の発見以前に知られていた 6 種類の炭酸固定経路⁽⁵⁾のうち, 還元的 TCA 回路 (rTCA 回路) もしくは Wood-Ljungdahl 経路 (WL 経路; 還元的アセチル CoA 経路とも呼ばれる) が以下に記す理由で古くから存在するのではないかと考えられてきた (図 3)。

WL 経路が最古であるという主張の理由としては, 他の経路がバクテリアもしくはアーキアのみから検出されているのに対し (rTCA 回路と還元的グリシン経路はバクテリアのみから見つかっている), WL 経路はバクテリアとアーキアの両方に存在することが挙げられる。これは, 両ドメインの分岐前に WL 経路が既に存在した可能性を示唆する。(ただし, WL 経路に関与する酵素遺伝子の一部は, バクテリアとアーキアにおいて起源を異にする。これについては, 現存の酵素が誕生する以前から鉱物等を利用した WL 経路の反応システムが存在したことを意味すると説明されている。⁽⁷⁾ また, WL 経路は系全体の反応 ($2\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 + \text{CoA} \rightarrow \text{アセチル CoA} + 3\text{H}_2\text{O}$) の自由エネルギー変化が最も小さく, 熱力学的に有利な反応であるというのも理由として挙げられる⁽⁸⁾。3 分子の CO_2

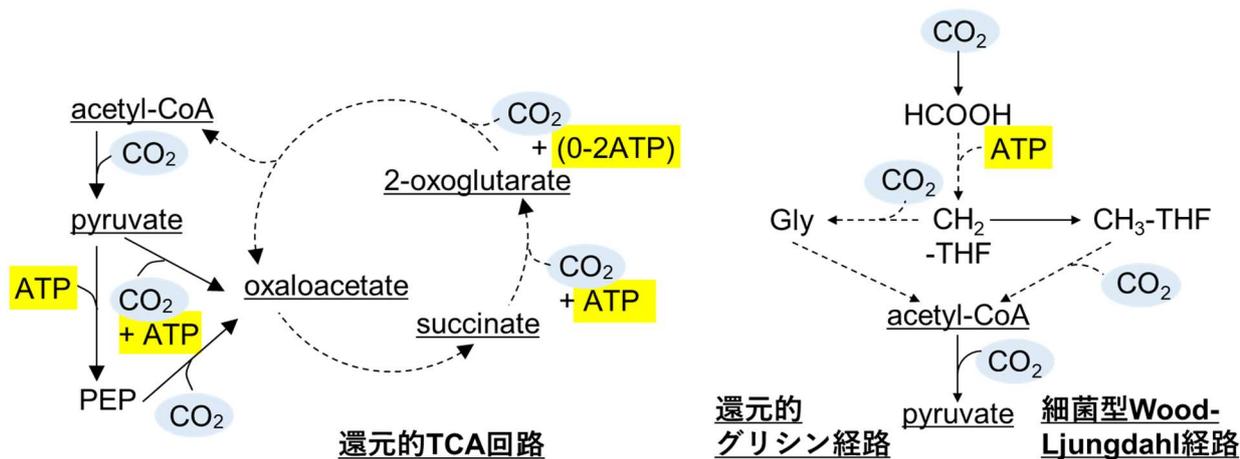


図 3 : 3 種類の炭素固定経路の比較

rTCA 回路は生成物であるアセチル CoA が次の反応の基質となる自己触媒経路であるのに対し、還元的グリシン経路と WL 経路は非自己触媒的で直線的な経路である。破線は複数の反応をまとめたことを意味する。(0-2ATP) は用いられる酵素によって ATP を消費する場合と消費しない場合があることを意味する。下線は「生体分子の生合成における 5 つの根源的な出発物質」を意味する。

から pyruvate を作るのに使われる ATP は 0-1 分子のみ^{注2}であり、これも最小である⁽⁹⁾。

一方、pyruvate を作るのに必要な ATP 量は、rTCA 回路が 1-4 分子^{注3}、還元的グリシン経路が 1-2 分子^{注4}と、5-9 分子必要な他の 4 経路と比較すると省エネである。また、rTCA 回路は生体分子の生合成における 5 つの根源的な出発物質、すなわちアセチル CoA、ピルビン酸、オキサロ酢酸、コハク酸、2-オキソグルタル酸の全てを提供できるという点でも注目されている⁽⁸⁾。さらに、WL 経路および還元的グリシン経路が直線的な反応であるのに対し、rTCA 回路は生成物が 2 周目の反応の基質となる自己触媒反応であるという点も興味深い⁽¹⁰⁾。これはひとたび反応が始まれば生成物が指数関数的に増えていくことを意味し、有機物を蓄積するという観点で都合な反応である。現在のような遺伝子にコードされた酵素タンパク質による代謝として最も古いかは別として、アミノ酸、核酸といった現在の代謝に不可欠な生体分子を非

生物的に作り、蓄積していったであろうプレバイオティックな世界において、rTCA 回路のような自己触媒系は大きな影響を与えたのではないかと考えられる。

なお、最古の炭酸固定経路は必ずしも WL 経路、rTCA 回路、還元的グリシン経路のいずれかであるとは限らない。既にお気づきの読者も多いと思うが、還元的グリシン経路は細菌型の WL 経路の一部を共にしている(図 3 右)。Clostridium drakei では WL 経路と還元的グリシン経路が同時に炭酸固定経路として機能しており⁽¹¹⁾、両経路の進化的関係について今後の研究が俟たれる。さらに、現存の Aquificae 門生物は rTCA 回路を用いているが、その祖先は rTCA 回路に加えて WL 経路(もしくは還元的グリシン経路)も有していた可能性を示唆するゲノム解析が報告されている⁽¹²⁾。最古の炭酸固定経路はこれら 3 つの代謝経路(の一部)を組み合わせたものだったのかもしれない。

現在、幅広い現存生物の系統関係とそれが有す

る代謝経路・酵素の比較解析により、我々の共通祖先の代謝を推定する研究が盛んに行われている。これまで、祖先型 CO₂ 固定代謝を推定するには、現存する独立栄養生物の CO₂ 固定代謝を比較解析することが一般的であった。一方で、還元的グリシン経路の発見により、CO₂ 固定代謝とグリシン・セリン生合成には密接な関係があることが再認識された。CO₂ 固定経路だけでなくグリシン・セリン生合成経路も比較解析のパラメータとして用いられれば、独立栄養生物だけでなく従属栄養生物も含む幅広い系統群の代謝情報を用いて祖先代謝を推定することができる。これにより推定の解像度および信頼度が向上し、より確からしい原始的な代謝マップを手に入れることができるのではないかと著者は期待している。

注² バクテリア型の経路の場合 ATP を 1 分子消費する。アーキア型経路は ATP を消費しない。

注³ 生物種によって使用する酵素が異なり、そのため使用する ATP 分子数が異なる⁽¹²⁾。また、オキサロ酢酸に 3 分子の CO₂ を固定してピルビン酸とオキサロ酢酸を作る反応ととらえるか、ピルビン酸に 4 分子の CO₂ を固定してピルビン酸とオキサロ酢酸を作る回路反応ととらえるかでも必要な ATP 数が異なる。

注⁴ ピルビン酸がアセチル CoA 経路で作られる場合は 1 分子、セリン経路で作られる場合は 2 分子必要である。

6. 新規セリン生合成酵素の発見ーリン酸化経路はより多くの生物に存在する

以上の背景より、現存生物がどの経路・酵素でグリシン・セリンを生合成しているのか明らかに

することが、アミノ酸生合成経路だけでなく CO₂ 固定代謝の進化を理解する上でも最重要課題の一つだと著者は考えている。そこで、どの生物がどの経路を用いてセリンを生合成しているか推定するために、比較ゲノム解析を行った⁽¹⁴⁾。その結果、3 ステップのリン酸化経路 (図 1) 酵素遺伝子のうち最初の 2 遺伝子を有しているものの、最後の反応を触媒するホスホセリン脱リン酸化酵素 (PSP) 遺伝子を欠くバクテリア (これらの多くは生理条件からグリシン・セリン生合成能力を有すると考えられる。) が多数存在することが判明した。これら生物は非リン酸化経路でセリンを作っているのだろうか? そうだとしたら、リン酸化経路の最初の 2 ステップで生じるホスホセリンは何のために作られているのだろうか? 注⁵

この疑問に答えるため、著者らは既知の PSP 遺伝子を欠く生物の細胞破砕液を用いて、PSP 活性の有無を確認してみた^(14,15)。その結果、驚くことに好熱性独立栄養性細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* および好熱性従属栄養性細菌 *Thermus thermophilus* からそれぞれ PSP 活性が検出された。そこでこれら細胞破砕液から活性を指標にタンパク質を精製し、PSP を同定した。これらは既知の PSP (type1) および互いに進化的に独立して生じたものであったことから、以降 type 2 および type 3 PSP と呼ぶ。これら PSP 遺伝子の破壊株はセリン要求性を示すことから、実際に両生物のセリン生合成に必須である^(15,16)。なお、type 2 PSP は *H. thermophilus* を含む Aquificae 門に加えて Cyanobacteria 門と Chloroflexi 門に、type3 PSP は *T. thermophilus* に加えて枯草菌を含む一部の Firmicutes 門生物にも存在することが明らかになった^(15,17)。これら生物は type 1 PSP 遺伝子を有さないことから、2 種の生物からの

PSP の発見は幅広い生物門のセリン生合成経路理解に貢献した。

Type 2, 3 PSP の発見は、リン酸化経路を用いたセリン生合成がこれまで知られていた以上に幅広い生物で使われていることを明らかにした。一方で新たな疑問も提示した。Type 1 PSP は 3 ドメイン全ての生物に存在することから、我々の共通祖先に既に存在したことが示唆される。一方で Type 2, 3 PSP はバクテリアの系統樹上でキメラ状に存在することから、これらの誕生は最大節約的には説明できず、Type 1 PSP を失って Type 2 もしくは Type 3 PSP を獲得するというイベントが進化の過程で独立して複数回起きたと考えられる (図 4)。なぜこのような複雑な進化が起きたのだろうか？これについては今後の研究が俟たれる。

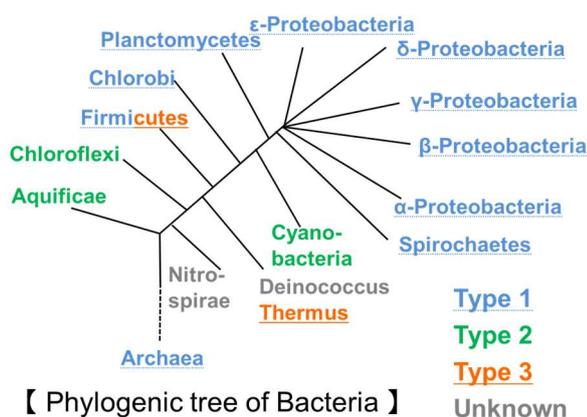


図 4: バクテリアにおける 3 種類の PSP の分布

注 5 一部の生物はホスホセリンからシステインを作ることが知られているが、既知の PSP 遺伝子を欠く生物の多くはこれとは異なるシステイン生合成経路を有していると遺伝子情報から推定された。

おわりに

最初の生命が CO₂ を固定する独立栄養生物だったのか、有機物を食べる従属栄養生物だったのか、はたまた両方が可能な混合栄養生物であったのかは、今なお議論が続いている⁽¹⁷⁾。しかし、CO₂ を固定可能な生命の誕生が、総体としての生命の持続的な繁栄に必須であったことを疑う人はいないだろう。なぜなら、非生物的に生じる有機物量だけで維持できるバイオマスには限りがあるからだ。原始生命はどのように CO₂ を固定していたのだろうか？また、どのような過程を経て現在のように複雑かつ洗練された代謝システムを獲得していったのだろうか？私は現存生物のセリン生合成経路の多様性解明を通じて、これからもこの謎に向き合っていきたい。

【コラム】

このコラムは高校生、大学1~2年生向けだそうです。私が高校生だった時、生物は美術と並んで最も好きな教科でしたが、代謝は嫌いでした。なぜなら暗記すべきことだらけだと思ったから。私は暗記が苦手です。大学生になってからも代謝忌避傾向は変わらず、興味があった生命の進化に近づけそうで、かつ代謝に無縁そう（だと当時は思ったのです。今になって考えればとんでもない間違いなのですが。）だとなんとなく思った「新規微生物の探索」を行える研究室を選びました。しかし、実際に研究を始めて新規微生物とは何かを深く考えるにつれて、代謝を抜きにしてそれを語ることはほぼ不可能であると悟りました。そしてまた、研究しつくされていて、教科書に載っていることが絶対的だと考えていた中心的代謝—解糖系、クエン酸回路、そしてアミノ酸生合成経路など—についても未解明な点がたくさんあることを知り

ました。特にマウスやシロイヌナズナや大腸菌といったモデル生物と呼ばれる生物以外の生物の代謝となると、わからないことだらけです。そして、未知の中心的代謝を明らかにすることは、生命の進化を理解する上ですごく重要なのです（詳しくは本文を読んでいただけると嬉しいです。）！！しかも、グリーンバイオケミストリーを通じて持続可能な社会の創成にも貢献できるかもしれません。私はそれに気づいてから、そして受験や単位取得のための試験から解放され、記憶を脳から外付け媒体（教科書、PC、実験ノートなどなど）に移してから、代謝の魅力に取りつかれてかれこれ10年以上代謝の研究を続けています。そして文字通り、代謝で飯が食えるようになってしまったのです。ありがたいことです。新しい代謝経路・酵素を見つけたときの興奮を一度味わってしまうと、なかなか他の研究に浮気できません。そのくらい代謝は魅力的…だと私は思うのです。

千葉 洋子，理化学研究所（Yoko CHIBA, RIKEN）

<略歴>2007年京都大学農学部卒業／2009年同大学大学院農学研究科博士前期課程修了／2012年東京大学大学院農学生命科学研究科博士後期課程修了【博士（農学）】／2012年筑波大学生命環境系助教および国立感染症研究所協力研究員／2016年海洋研究開発機構ポスドクトラル研究員／2019年理化学研究所研究員，2021年理化学研究所上級研究員，現在に至る。

【引用文献】

- 1) 千葉洋子：農芸化学若手女性研究者賞 受賞者講演要旨 未知の中心的代謝酵素の探索と性状解析 ―生命の多様性および進化の理解を目指して, <https://www.jsbba.or.jp/wp-content/uploads/file/45-46.pdf>. (2020)
- 2) G. Fuchs: *FEMS Microbiol. Rev.*, **2**, 181(1986).
- 3) I. Sánchez-Andrea, IA. Guedes, B. Hornung, S. Boeren, C. E. Lawson, D. Z. Sousa, A. Bar-Even, N. J. Claassens & A. J. Stams: *Nat. Commun.*, **11**, 5090(2020).
- 4) A. Satanowski & A. Bar-Even: *EMBO Rep.*, **21**, e50273(2020).
- 5) S. Kim, S. N. Lindner, S. Aslan, O. Yishai, S. Wenk, K. Schann & A. Bar-Even: *Nat. Chem. Biol.*, **16**, 538(2020).
- 6) 石井正治：生物工学会誌: *seibutsu-kogaku kaishi*, **90**, 165(2012).
- 7) W. Martin, J. Baross, D. Kelley & M. J. Russell: *Nat. Rev. Microbiol.*, **6**, 805(2008).
- 8) 北台紀夫, 青野真士 & 大野克嗣：地球化学, **50**, 155(2016).
- 9) I. A. Berg, D. Kockelkorn, W. H. Ramos-Vera, R. F. Say, J. Zarzycki, M. Hügler, B. E. Alber & G. Fuchs: *Nat. Rev. Microbiol.*, **8**, 447(2010).
- 10) A. Blokhuis, D. Lacoste & P. Nghe: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **117**, 25230(2020).
- 11) Y. Song, J. S. Lee, J. Shin, G. M. Lee, S. Jin, S. Kang, J.-K. Lee, D. R. Kim, E. Y. Lee & S. C. Kim: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **117**, 7516(2020).
- 12) D. Giovannelli, S. M. Sievert, M. Hügler, S. Markert, D. Becher, T. Schweder & C. Vetriani: *Elife*, **6**, e18990(2017).
- 13) 亀谷将史, 新井博之 & 石井正治：極限環境生物学会誌, **18**, 30(2020).
- 14) Y. Chiba, K. Oshima, H. Arai, M. Ishii & Y. Igarashi: *J. Biol. Chem.*, **287**, 11934(2012).
- 15) Y. Chiba, A. Yoshida, S. Shimamura, M. Kameya, T. Tomita, M. Nishiyama, M. & K. Takai: *FEBS J.*, **286**, 726(2019).
- 16) K. Kim, Y. Chiba, A. Kobayashi, H. Arai & M. Ishii: *J. Bacteriol.*, **199**, e00409(2017).
- 17) Y. Chiba, S. Horita, J. Ohtsuka, H. Arai, K. Nagata, Y. Igarashi, M. Tanokura & M. Ishii: *J. Biol. Chem.*, **288**, 11448(2013).
- 18) 高井研：“生命の起源はどこまでわかったか 深海と宇宙から迫る”，岩崎書店，2018.