炭酸固定補充反応[†]

乾 将行, 湯川英明

((財)地球環境産業技術研究機構)

Key words: anaplerotic pathway; CO₂ fixation; photosynthetic bacteria; phosphoenolpyruvate; oxaloacetate

1. はじめに

生物種における二酸化炭素の固定は、高等植物や藻類では、主としてカルビンサイクルにより固定されているのに対して、微生物は、進化の過程でさまざまな環境に適応するよう種々の炭酸固定経路（カルビンサイクルの他に、還元的 TCA 回路、アセチル CoA 回路、グリシン経路、セリン経路など）を有することが知られている。

一方、生体内の代謝系においては可逆反応を含めて二酸化炭素 (CO₂, HCO₃⁻) を基質とする酵素が多種類存在し、特に微生物ではその経路の多様性のゆえに、より多くの酵素が代謝上重要な働きを担っていることが知られている。

本稿の前半では、これら広義な二酸化炭素固定酵素群の中で、アナプレロティック機能を担う酵素を取り上げ、その特性と研究の現状をまとめる。同酵素は解糖系またはカルビンサイクルによって生じた C₃ 化合物に、二酸化炭素を固定して C₄ ジカルボン酸を合成し、TCA 回路を円滑に回転させる重要な役割を担っている。本稿後半では、光合成細菌のアナプレロティック機能に焦点を絞りわれわれの研究室で得られた知見を併せ紹介する。

2. ホスホエノールビルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC)

〈酵素的性質〉

PEPC は、ホスホエノールビルビン酸 (PEP) に HCO₃⁻ を固定してオキサロ酢酸 (OAA) を生成する反

応を不可逆的に触媒する酵素で (図 1)、植物、原生生物、および大部分の細菌に存在するが、動物、カビ、酵母には存在しない。その生理的役割としては TCA 回路の円滑な回転やアミノ酸などの生合成のために C₄ ジカルボン酸を供給すること、さらに植物では、この他、細胞内 pH 調節、窒素固定、浸透圧調節等々の多彩な生理的役割を有していることが報告されている⁽¹⁾。

本酵素は、今まで調べられた生物種においては分子量約 100 kDa の同一サブユニット 4 量体からなり、一部のラン藻を除いてアロステリックな調節を受け、

酵素名	EC 番号	反応様式
PEPC	4.1.1.31	$\text{PEP} + \text{HCO}_3^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{OAA} + \text{P}_i$
PEPCK	4.1.1.49 (ATP 依存性) 4.1.1.32 (GTP 依存性)	$\text{OAA} + \text{NTP} \rightleftharpoons \text{PEP} + \text{CO}_2 + \text{NDP}$
PC	6.4.1.1	$\text{PA} + \text{HCO}_3^- + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{OAA} + \text{ADP} + \text{P}_i$
PEPCTrP	4.1.1.38	$\text{PEP} + \text{CO}_2 + \text{P}_i \rightleftharpoons \text{OAA} + \text{PP}_i$

図 1 アナプレロティック酵素と関連する代謝経路
PEPC; ホスホエノールビルビン酸カルボキシラーゼ, PEPCK; ホスホエノールビルビン酸カルボキシキナーゼ, PC; ビルビン酸カルボキシラーゼ, PEPCTrP; ホスホエノールビルビン酸カルボキシホスホリラーゼ, PEP; ホスホエノールビルビン酸, OAA; オキサロ酢酸, PA; ビルビン酸

[†] Anaplerotic Reactions in Carbon Dioxide Fixation
Masayuki INUI and Hideaki YUKAWA (Research Institute of Innovative Technology for the Earth (RITE))

阻害因子としてアスパラギン酸やリンゴ酸, 活性化因子としてアセチル CoA やフルクトース 1,6-ビスリン酸, GTP などが知られている。

大腸菌 PEPC 酵素については, 結晶化が報告され, X 線結晶解析が進められているが, 3 次構造については未だ明らかにされていない。

PEPC 遺伝子は, 大腸菌, 光合成細菌, コリネ型細菌, 好熱性細菌, ラン藻, トウモロコシなど 20 種以上の一次構造が明らかにされ, 現在, 大腸菌 PEPC 遺伝子については, 部位特異的変異導入により活性中心やアロステリック部位など活性調節機能の解析が進められている。X 線結晶解析と併せて, 立体構造の解析による詳細な酵素機能解明が期待される。

〈代謝系における役割〉

細菌における PEPC は, 代謝系における生理的役割に若干の違いが見られる。PEPC が唯一のアナプレロティック酵素として存在する場合と複数のアナプレロティック酵素が存在する場合に分かれ, 後者の場合 PEPC の「比重」もさまざまである。

前者の例としては大腸菌において, PEPC 欠損株が唯一の炭素源としてグルコースを含む最少培地において増殖できないことから, PEPC がアナプレロティック酵素として必須であると報告されている⁽²⁾。

一方, *Corynebacterium glutamicum* では, PEPC 欠損株は, グルコースを唯一の炭素源として含む最少培地において野生株と同様の増殖特性を示し, さらにリジン生産性も変化しないことから, PEPC 以外のアナプレロティック酵素が存在すること, また, PEPC の「比重」がかなり低いことが示唆されている^(3, 4)。

Rhodospseudomonas palustris では, PEPC 欠損株が, ピルビン酸を唯一の炭素源とする最少培地において, 野生株に比べて増殖速度が低下するものの増殖可能であることから, 他のアナプレロティック酵素が存在するが, PEPC の「比重」がかなり高いことが示唆されている⁽⁵⁾。

〈細胞外からの二酸化炭素固定への関与〉

光合成細菌の二酸化炭素固定機能においても, アナプレロティック酵素が強く関与していると考えられる結果が報告されている。

紅色硫黄細菌 *Chromatium vinosum* では, $^{14}\text{CO}_2$ を用いた光合成炭酸固定初期過程の解析において, RubisCO による産物である糖リン酸エステルが

$^{14}\text{CO}_2$ 固定産物として多くを占めており RubisCO が主機能であることは間違いないものの, 約 20% の放射活性がアスパラギン酸に認められ, おそらく PEPC が大きく関わっていることが推測されている⁽⁶⁾。

紅色非硫黄細菌 *Rhodospirillum rubrum* においても同様の実験により, リンゴ酸などの有機酸生育菌の場合, 無機栄養生育菌の場合に比べて, RubisCO 以外の炭酸固定反応に由来する化合物の割合が増大することが報告されている。

3. ピルビン酸カルボキシラーゼ (PC)

PC は, ATP 存在下ピルビン酸に炭酸を固定して, OAA を生成する反応を可逆的に触媒する酵素で (図 1), 動物, 酵母, カビの他, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas* など, 一部の細菌にも存在することが報告されている。おそらく, PEPC の存在しない細胞においては, PEPC と同様の生理的機能を担っているものと思われる。一方, *Pseudomonas citronellolis*⁽⁷⁾, *P. fluorescens*⁽⁸⁾, *Azotobacter vinelandii*⁽⁹⁾, *Thiobacillus novellus*⁽¹⁰⁾ や *Rhodospirillum rubrum*⁽¹¹⁾ については, PEPC および PC の両酵素が存在することが知られている。しかしながら, これら両酵素遺伝子がどのような発現メカニズムにより制御され, どのように生理的役割分担をしているかは明らかにされていない。

Corynebacterium glutamicum では, 前述のように PEPC がアナプレロティック酵素としての「比重」が低いことが報告されていたが, 最近, PC 活性を保有していることが確認され, 本酵素がグルコース (もしくは乳酸) が唯一の炭素源の場合にアナプレロティック酵素として重要な働きをしていることが示唆された⁽¹²⁾。

4. ホスホエノールピルビン酸カルボキシホスホラーゼ (PEPCTrP)

PEPCTrP は, PEPC と同様に PEP に炭酸を固定して OAA を生成する反応を可逆的に触媒する酵素で (図 1), *Propionibacterium shermanii*, *Entamoeba histolytica* に存在することが報告されている。本酵素は, 前者からは精製, 結晶化がなされており, 分子量 4.3 万でサブユニット 4 個からなり, 反応には Mg^{2+} または Mn^{2+} が必要である。PEPC と大きく異なる点は, PEPC が不可逆反応であるのに対して可逆反応であること, 二酸化炭素非存在下に PEP と Pi からピルビン酸と PPi を生じる反応を触媒することなどが挙

げられる。しかし、その他の生物には見いだされていないこと、遺伝子構造が明らかにされていないことなどから、生理的機能などについての詳細は不明である。

5. ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK)

PEPCK は、通常、OAA から脱炭酸して PEP を生成する反応を触媒する酵素であり (図 1)、糖新生に関与していることが知られている。しかしながら、本酵素は可逆的であり、*Alcaligenes eutrophus*⁽¹³⁾, *Ascaris suum*⁽¹⁴⁾, *Trypanosoma cruzi*⁽¹⁵⁾ のような一部の生物では、PEPC と同様にアナブレロティック酵素として生体内で PEP に炭酸を固定して OAA を生成する反応を触媒していることが報告されている。

PEPCK は、細菌、酵母、原虫、植物では ATP 依存性酵素として、その他の真核生物、動物では GTP 依存性酵素として存在し、二つのグループに分類される。細菌由来 PEPCK が単量体⁽¹⁶⁾ であるのを除けば、ATP 依存性 PEPCK は 2 量体⁽¹⁷⁾, 4 量体^(18, 19), 6 量体⁽²⁰⁾ などの多量体であるのに対して、GTP 依存性

PEPCK は、単量体である。二つのグループ間で全域にわたるのアミノ酸レベルのホモロジーは見いだされないが、NTP 結合部位や OAA 結合部位などの保存された配列が存在する。

大腸菌 PEPCK 酵素については、すでに結晶化⁽²¹⁾ および X 線結晶解析による 3 次元構造が明らかにされている^(22, 23)。

アナブレロティック反応を触媒する PEPC あるいは PC に対して、糖新生に関与するとされている PEPCK が炭素代謝フローにおいてどのようなバランスで発現制御されているかは非常に興味深い、明瞭な知見は得られていない。

6. 光合成細菌 (紅色非硫黄細菌) のアナブレロティック酵素の解析

紅色非硫黄細菌は、暗好気条件および二酸化炭素を固定する明嫌気条件での増殖が可能で、両条件下でのアナブレロティック酵素の解析は、炭素代謝フローの制御メカニズムを理解するうえで重要である。

従来、一つのグループとして紅色非硫黄細菌として位置付けられていた細菌群は、近年、16S rRNA 遺伝

図 2 紅色非硫黄細菌の系統樹

R., *Rhodopseudomonas*; *B.*, *Bradyrhizobium*; *Rp.*, *Rhodoplanes*; *Rs.*, *Rhodospirillum*; *Rc.*, *Rhodocyclus*; *Rb.*, *Rhodobacter*; *E.*, *Escherichia*; *Rh.*, *Rhizobium*.

* 紅色非硫黄細菌以外のものを示す。

表 紅色非硫黄細菌におけるアナブレロティック酵素の活性分布

	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	<i>Rhodospirillum rubrum</i>
PEPC	+	—	—	+
PC	—	+	+	+
PEPCK	+	+	+	+

+, 活性が検出されているもの; —, 活性が検出されていないもの。

子の解析により, 系統学的にいくつかのグループに分類されることが明らかにされつつあり (図 2), これに対応するようにアナプレロティック酵素の異なる活性分布が認められるというたいへん興味深い知見が明らかになってきた (表). PEPC の項で紹介した *Rs. rubrum* 知見にみられるように, 紅色非硫黄細菌においてはアナプレロティック酵素が二酸化炭素固定経路において重要な働きを担っていることが推察され, これら酵素遺伝子の発現制御メカニズムは非常に興味をもたれる. 現在われわれは, 紅色非硫黄細菌群より PEPC および PEPCK 遺伝子を単離, 塩基配列, および転写制御の解析などを行うとともに⁽⁵⁾, 両遺伝子破壊株を構築し, 明嫌気, 暗好気条件下における増殖特性, 炭酸固定速度などを解析中である.

今後, これらの知見の蓄積により, 光合成細菌のアナプレロティック経路の炭酸固定への関与, 暗好気, および光嫌気条件下におけるアナプレロティック酵素が関わる炭素代謝フロー制御メカニズムなどの解明を目指す.

7. おわりに

近年, 地球温暖化対策として, 効率的かつ実用的な二酸化炭素固定プロセスの開発が強く望まれており, 生物を用いたプロセスが注目を集めているが, 微生物のもつ多様な二酸化炭素固定機能を利用し, さらに分子生物学的手法等による固定効率の向上が期待される.

アナプレロティック経路は, 解糖系あるいはカルビンサイクルと TCA 経路をつなぐ key 反応であり, 微生物におけるその多様性に見られるように, 複雑な制御メカニズムを有することが推察される.

これらの詳細な解析は二酸化炭素固定経路の起源と進化を理解しその応用面を考えていくうえで重要な鍵を握るものと思われる.

- (1) E. Latzko and G. J. Kelly: *Physiol. Veg.*, **21**, 805-815 (1983).
- (2) Y.-P. Chao and J. C. Liao: *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 4261-4265 (1993).
- (3) P. G. Peters-Wendisch, B. J. Eikmanns, G. Thierbach, B. Bachmann, and H. Sahm: *FEMS Microbiol. Lett.*, **112**, 269-274 (1993).
- (4) M. Gubler, S. M. Park, M. Jetten, G. Stephanopou-

- los, and A. J. Sinskey: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **40**, 857-863 (1994).
- (5) M. Inui, V. Dumay, K. Zahn, H. Yamagata, and H. Yukawa: *J. Bacteriol.*, **179**, 4942-4945 (1997).
- (6) R. E. Hurlbert and J. Lascelles: *J. Gen. Microbiol.*, **33**, 445-458 (1963).
- (7) R. W. O'Brien, D. T. Chuang, B. L. Taylor, and M. F. Utter: *J. Biol. Chem.*, **252**, 1257-1263 (1977).
- (8) S. R. Milrad de Forchetti and J. J. Cazzulo: *J. Gen. Microbiol.*, **93**, 75-81 (1976).
- (9) M. C. Scrutton and B. L. Taylor: *Arch. Biochem. Biophys.*, **164**, 641-654 (1974).
- (10) A. M. Charles and D. W. Willer: *Can. J. Microbiol.*, **30**, 532-539 (1984).
- (11) E. N. Kondratieva: Interrelation between modes of carbon assimilation and energy production in phototropic purple and green bacteria, p. In "International Review of Biochemistry," Vol. 21, ed. by J. R. Quayle, Microbial Biochemistry, University Park Press, Baltimore (1979), pp. 117-175.
- (12) P. G. Peters-Wendisch, V. F. Wendisch, S. Paul, B. J. Eikmanns, and H. Sahm: *Microbiology*, **143**, 1095-1103 (1997).
- (13) P. Schobert and B. Bowien: *J. Bacteriol.*, **159**, 167-172 (1984).
- (14) D. A. Christie, J. W. Powell, J. M. Stables, and R. A. Watt: *Mol. Biochem. Parasitol.*, **24**, 125-130 (1987).
- (15) C. Cymeryng, J. J. Cazzulo, and J. J. B. Cannata: *Mol. Biochem. Parasitol.*, **73**, 91-101 (1995).
- (16) A. H. Goldie and B. D. Sanwal: *J. Biol. Chem.*, **255**, 1399-1405 (1980).
- (17) J. A. Urbina: *Arch. Biochem. Biophys.*, **258**, 186-195 (1987).
- (18) P. Tortora, G. M. Hanozet, and A. Guerritore: *Anal. Biochem.*, **144**, 179-185 (1985).
- (19) R. P. Walker, S. J. Trevanion, and R. C. Leegood: *Planta*, **196**, 58-63 (1995).
- (20) P. M. Finnegan and J. N. Burnell: *Plant Mol. Biol.*, **27**, 365-376 (1995).
- (21) L. T. J. Delbaere, M. Vandselaar, D. Glaeske, C. Jabs, and H. Goldie: *J. Mol. Biol.*, **219**, 593-594 (1991).
- (22) A. Matte, H. Goldie, R. M. Sweet, and L. T. J. Delbaere: *J. Mol. Biol.*, **256**, 126-143 (1996).
- (23) L. W. Tari, A. Matte, U. Pugazhenth, H. Goldie, and L. T. J. Delbaere: *Nat. Struct. Biol.*, **3**, 355-363 (1996).