

アーキアが有する光合成カルビンサイクル酵素ホモログの
機能解析

河野 卓成

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 植物代謝制御学研究室

(出村 拓 教授)

平成28年12月13日提出

所属 (主指導教員)	植物代謝制御研究室 (出村 拓 教授)		
氏名	河野 卓成	提出	平成28年12月13日
題目	アーキアが有する光合成カルビンサイクル酵素ホモログの機能解析		

カルビンサイクルは植物や藻類、光合成細菌等の光合成生物が利用する、光合成反応における主要な CO₂ 固定経路であり、11 種の酵素が触媒する 13 反応ステップから構成されている。その中でも CO₂ 固定酵素である ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) と、ribulose-5-phosphate (Ru5P) から RuBisCO の CO₂/O₂ アクセプター基質である ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) を合成する phosphoribulokinase (PRK) は、RuBisCO とともに本回路の鍵酵素である。近年のゲノム解析から、非光合成生物であるアーキアの多くが RuBisCO を有することが明らかにされたが、同時に PRK を有しているという報告はなかった。これらのアーキアでは、PRK を利用しない代替経路によって合成された RuBP を基質に RuBisCO が CO₂ 固定を行うことが予想されている。私は、メタン菌 *Methanospirillum hungatei* を始めとする、いくつかのアーキアが RuBisCO と PRK 両ホモログ遺伝子を同時に有していることを見出した。そこで、アーキアが持つ2つのカルビンサイクル鍵酵素ホモログの機能及びアーキアと光合成生物の関連性を調べる目的で研究を行った。

ゲノム解読が完了しているアーキアの内、15 種のアーキアが RuBisCO ホモログ遺伝子と PRK ホモログ遺伝子を同時に有していた。本研究では、メタン菌 *M. hungatei* を主な研究対象として解析を進めた。*M. hungatei* RuBisCO ホモログと PRK ホモログの大腸菌リコンビナントタンパク質を用いて酵素活性の有無を解析した結果、それぞれ CO₂ 固定活性 (0.146 μmol/min/mg) と PRK 活性 (29.17 μmol/min/mg) が検出された。さらに、*M. hungatei* 以外の 4 種のアーキア (メタン菌 *Methanosaeta thermophila*, *Methanosaeta concilii*, *Methanoculleus marisnigri* 及び超好熱性アーキア *Archaeoglobus profundus*) が持つ PRK ホモログに関しても、酵素学的解析を行った。その結果、これら全てが PRK 活性を示し、光合成生物に特異的だと考えられていた PRK が、非光合成生物であるアーキアにも広く存在していることが明らかとなった。アーキア型 PRK の酵素学的特徴として、V_{max} は光合成生物 PRK と比較して低く、基質 Ru5P に対する親和性は同程度、特に ATP に対する親和性が高い傾向が示された。

アーキア型と光合成型 PRK の構造比較を行うため、松村浩由博士ら(立命館大生命科学)との共同研究として、*M. hungatei* PRK の結晶構造解析を行った。*M. hungatei* PRK と細菌型、植物型 PRK とのアミノ酸配列相同性は約 30% 程度と低いものの、単量体構造は両者とも非常に良く似ていた。興味深いことに、二量体形成様式は植物型 PRK と非常に似て

おり、バクテリア型 PRK とは全く異なっていた。また、*M. hungatei* PRK と植物型 PRK では、ATP 結合に関与するとされるアミノ酸残基と活性中心の構造が異なっており、これが ATP 親和性に違いを生じさせる原因であると予想された。

これらの結果より、アーキアにおいて RuBisCO と PRK が機能するカルビンサイクル様代謝経路が機能していることが期待されたが、ゲノム情報より *M. hungatei* を含む PRK 遺伝子を有するアーキアは 3 つのカルビンサイクル酵素 (transketolase、sedohepulosylase、ribulose-5-phosphate 3-epimerase) 遺伝子を有しておらず、カルビンサイクル上の fructose-6-phosphate (F6P) から Ru5P への経路が断たれていた。アーキアはペントースリン酸経路を有しておらず、ribulose monophosphate (RuMP) 経路の酵素である 6-phospho-3-hexuloisomerase (PHI) と hexulose-6-phosphate synthase (HPS) の逆反応を利用して、F6P から Ru5P を生成していることが予想されているが、*M. hungatei* もこれらのホモログ遺伝子を有していた。そこで、*M. hungatei* HPS ホモログの大腸菌リコンビナントタンパク質を用いて活性測定を行った結果、HPS 活性が検出された。興味深いことに、*M. hungatei* は 2 つの PHI ホモログを有しており、それぞれ単独では PHI 活性を示さず、2 つの PHI ホモログが共存する場合のみ PHI 活性が検出された。これらの結果から、*M. hungatei* を始めとする RuBisCO と PRK を持つアーキアにおいて、RuBisCO と PRK を利用した原始カルビンサイクルとも言える新規炭素代謝経路、 α Reductive hexulose phosphate pathway (RHP) 経路を予想した。

実際に RHP 経路が生体内で機能しているか調べるために、蓮沼誠久博士ら(神戸大院科学技術イノベーション)との共同研究として $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ を用いた ^{13}C 標識メタボローム解析を行った。その結果、標識時間の経過に伴って ^{13}C が取り込まれた RHP 経路の各中間代謝産物の比率が増加した。特に、RuBisCO の CO_2 固定反応によって生成する 3-phosphoglycerate (3-PGA) への ^{13}C 標識率が高かったことから、*M. hungatei* において RuBisCO の触媒反応が主要な CO_2 固定ステップであることが明らかになった。さらに解糖系及び糖新生の中間代謝産物にも ^{13}C 取り込みが観察され、RuBisCO によって固定された炭素の大部分が、glucose-6-phosphate を経由して糖新生へ、また phosphoenolpyruvate を経由して解糖系へ供給されていることが分かった。また、低い標識率であったが、明らかな Ru5P への ^{13}C 取り込みが観察されたことから、*M. hungatei* において RHP 経路が機能していることが示唆された。

本研究によって、これまでに同定されていた光合成型 PRK に加え、アーキア型 PRK の存在を明らかにした。また、*M. hungatei* を含む一部のアーキアにおいて、RuBisCO と PRK を利用した新規炭素代謝経路、RHP 経路を発見した。RHP 経路とカルビンサイクルは数ステップのみが異なっていること、またアーキアの進化的位置から、この RHP 経路がカルビンサイクルの進化的原型であると考えられる。本研究の成果はカルビンサイクルの祖先経路をアーキアに見出し、光合成システムの基盤がアーキアで構築されていたことを明らかにしたもので、アーキアからの光合成生物進化を議論するうえで、今後の研究に重要な知見となることが期待される。

目次

本論文で用いた略号

第 1 章．緒論

第 2 章．アーキアにおけるカルビンサイクル酵素ホモログの機能解析

第 3 章．*Methanospirillum hungatei* における RuMP 経路酵素の解析

第 4 章．*Methanospirillum hungatei* 菌体を用いた解析

第 5 章．*Gloeobacter violaceus* の有する PRK ホモログの解析

第 6 章．総括

謝辞

参考文献

本論文で用いた略号

ADH; alcohol dehydrogenase
AMP; adenosine mono-phosphate
CA; carbonic anhydrase
CP; creatine phosphate
FA; formaldehyde
Fae; formaldehyde activating enzyme
F6P; fructose-6-phosphate
G6PDH; glucose-6-phosphate dehydrogenase
GAP; glyceraldehyde-3-phosphate
GAPDH; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Gv; *Gloeovacter violaceus*
H₄MPT; 5,6,7,8-Tetrahydromethanopterin
Hu6P; 3-hexulose-6-phosphate
HPS; 3-hexulose-6-phosphate synthase
LDH; lactate dehydrogenase
Mg; *Mycobacterium gastri*
Mh; *Methanospirillum hungatei*
OPPP; oxidative pentose phosphate pathway
PGI; phosphogluco isomerase
PGK; 3-phosphoglycerate kinase
PHI; 6-phospho-3-hexuloisomerase
PK; pyruvate kinase
PRK; phosphoribulokinase
RHP pathway; reductive hexulose phosphate pathway
RPE; ribulose-5phosphate 3-epimerase
Ru5P; ribulose-5-phosphate
RuBisCO; ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase
RuBP; ribulose-1,5-bisphosphate
SBPase; sedoheptulose-1,7-bisphosphatase
Xu5P; xylulose-5-phosphate

第 1 章 緒論

地球が誕生してから現在までの約 46 億年の間、地球環境は大きく変化してきた。原始地球の大気は主にヘリウムと水素で構成されていたが、その後の火山の噴火に伴い、CO₂とメタン、アンモニアが放出された。この時の大気には水蒸気と窒素も含まれていたが、酸素は存在せず、地球はまだ高温高压だった。しかし、次第に温度が下がるに連れ、原始大気に含まれていた水蒸気が凝結し、雨として地表に降り注いだ。これが原始地球における海の誕生であり、グリーンランドで発見された火山岩の解析から、約 38~40 億年前に起きたと考えられている (Glikson, 1972)。そしてこれをきっかけに、原始生物が誕生したと考えられている。現在確認されている最古の生命とされているのは、西オーストラリアで見つかった 34 億年前のバクテリアと思われる化石とされており (Schopf and Packer, 1987; Wacey et al., 2011)、最近グリーンランドの岩石から、38 億年前の海に生息していた微生物の断片だと思われる痕跡が発見された (Ohtomo et al., 2014)。また、炭素同位体 ¹³C の解析から、38 億年前以前に生物的炭素固定が行われていた可能性が示唆されている (Mojzsis et al., 1996; Olson, 2006)。この時、紫外線による水蒸気の光分解で酸素が生じていたが、鉄の酸化によってすぐに消費されていたため、大気中にはまだ酸素が存在しない、絶対嫌気状態だった。そのため原始生物も嫌気呼吸を行うような絶対嫌気性であり、これらの生物にとって酸素は猛毒であった。

しかしながら約 26 億年前より以前、酸素発生型光合成によって酸素を生成する生物、シアノバクテリアが誕生した (Olson, 2006; Kazmierczak and Altermann, 2002)。シアノバクテリアによって産出された酸素は、数億年の間、海洋中に存在する鉄によって吸収され、海底に酸化鉄として堆積した。そして約 20 億年前、海洋中の鉄が全て酸化されると、酸素は大気中に放出され始め、大気中の酸素濃度は急上昇した (Fig. 1-1)。これにより、嫌気性の原始生物は大量絶滅し、酸素を好気呼吸に利用できる生物の進化を促した。このように、地球における光合成生物の出現は、地球大気環境に多大な影響を与えてきた。また、生物進化における光合成能力の獲得は、植物が大繁殖するに至った緑の革命を起こし、これなくしては、人類の繁栄もなかった。

光合成は、光化学系によって太陽の光エネルギーを化学エネルギーに変換する明反応と、このエネルギーを用いて CO₂ を固定するための暗反応に分けられる (Bassham et al., 1950; Raval et al., 2005)。

酸素発生型光合成生物では2つの光化学系 I と II で、酸素非発生型光合成生物では1つの光化学系で明反応が行われる。光化学系 I と II はそれぞれ異なる起源をもっており、光化学系 I は緑色硫黄細菌やヘリオバクテリア、光化学系 II は紅色細菌や緑色糸状細菌が起源だとされている (Blankenship and Hartman, 1998; Lockhart et al., 1996)。現在でも詳しいことは分かっていないが、これらの細菌間での融合や共生、遺伝子水平伝播などが起こり、光化学系 I, II どちらも有する酸素発生型光合成生物が誕生したと考えられている (Fish et al., 1985; Nelson and Ben-Shem, 2002)。

一方、暗反応は CO₂ 固定経路であり、植物や藻類、光合成細菌等の酸素発生型光合成を行う生物は、カルビンサイクル (Calvin-Benson-Bassham(CBB) cycle, Reductive pentose phosphate cycle)を利用して CO₂ 固定を行っている。現在6種類の CO₂ 固定経路が報告されているが、カルビンサイクルは中でも主要な経路であり (Bassham et al., 1950; Berg et al., 2010)、年間1,400億トンもの CO₂ がこのカルビンサイクルによって有機物に固定されている (Thauer, 2011)。

カルビンサイクルは大きく3つの反応過程に分けられる。1. 炭素固定: ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO)のカルボキシラーゼ反応により、ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP)へ CO₂ を固定し、2分子の3-phosphoglycerate (3-PGA)を生成する。2. 炭素の還元: 次に、3-PGAは2段階の酵素反応によって glyceraldehyde 3-phosphate (GAP)となる。3. RuBP再生: 一部の GAPは光合成産物としてショ糖やデンプンの合成に使われるが、残りの炭素は10段階の触媒反応によって RuBP に再生される (Fig. 1-2)。カルビンサイクルは計11種の酵素反応で構成されており、ほとんどは主要一次代謝である解糖系や糖新生、ペントースリン酸経路の酵素で代替可能である (Fig. 1-2)。その中でも、CO₂ 固定酵素の RuBisCO と、ribulose 5-phosphate (Ru5P)から RuBisCO の基質 RuBP を合成する、phosphoribulokinase (PRK)はこの回路のみで機能し、カルビンサイクルの鍵酵素である。先に挙げたように、光化学系の起源が解明されつつある一方で、CO₂ を固定するためのカルビンサイクルが進化の過程でどのように完成したかという点に関しては、ほとんど研究がされていない。

RuBisCOはそのアミノ酸配列から、植物や藻類、シアノバクテリアが利用するform I、光合成バクテリア及び一部のメタン菌が利用するform II、そして非光合成生物であるアーキアが有するform IIIに分類される。更に、RuBisCOとしての機能は無いが、RuBisCOの進化的別形態だと考えられているform IV、RuBisCO-like protein (RLP) がある (Watson et al., 1999; Ashida et al., 2003; Finn and Tabita, 2003; Fig. 1-3)。2017年2月の段階でゲノム解読が完了したアーキアの1/3程度が、form III (一部form II) RuBisCO遺伝子を有していることが分かっている。しかし、アーキアがPRKを有しているという報告はこれまでにない。2007年にSatoらにより、PRKを有していない超好熱性アーキア*Thermococcus kodakaraensis*において、カルビンサイクルとは異なり、nucleoside monophosphate (NMP)からAMP phosphorylaseによる加リン酸分解反応 (Fig. 1-4 赤)と、ribose-1,5-bisphosphate isomerase (RiBP isomerase)による異性化反応 (Fig. 1-4 青)の2段階の酵素反応ステップを介して合成されたRuBPに対し、RuBisCOがCO₂固定を行うことが予想されている (Sato et al., 2007; Aono et al., 2012, 2015; Fig. 1-4)。私は本研究において、いくつかのアーキアがRuBisCO、PRKホモログ遺伝子を同時に有していることを見出した。これらアーキアのRuBisCOとPRKホモログは、光合成RuBisCO、PRKとそれぞれ約30%のアミノ酸配列相同性を示す。光合成PRKは系統樹において、光合成細菌などの酸素非発生源光合成生物の持つバクテリア型PRKと、植物や藻類、シアノバクテリアといった酸素発生源光合成生物の植物型PRKグループに分類される (Miziorko, 2000)。しかし、アーキアのPRKホモログはこれらとは独立したクレードを形成し、第3のPRKグループを構成する。

生物進化上でも特に起源が古いと考えられているアーキアだが、地球上の物質循環においても、アーキアによる炭素、窒素、硫黄における物質循環への寄与は計り知れない (Baker and Banfield, 2003; Francis et al., 2007; Thauer, 2011)。さらにアーキアは、メタン発酵やその特殊な生育環境から、様々な条件で使用可能な有用酵素の単離等が研究されている (Takagi et al., 1997; Norris et al., 2000; Akutsu et al., 2015)。しかしながら、その特殊な代謝経路とアーキア以外の生物が利用している代謝経路との進化的な関係性は不明な点が多い。本研究はその中でも、アーキアにカルビンサイクルの原型を探るもので、光合成カルビンサイクルの進化的完成を紐解く重大な研究であると考えている。そのために、大腸菌リコンビナントタンパク質を用いた、一部のアーキアが有するカルビンサイクル鍵酵素ホモログタンパク質の機能解析を

主軸として研究を進めた。さらにアーキアの菌体を用いて、菌体抽出溶液による酵素活性の検出や、メタボローム解析などから、アーキアが有するカルビンサイクル鍵酵素ホモログタンパク質が機能しうる新規代謝経路の発見と、アーキア生体内における機能解明を行った。これらに加えて、原始的なシアノバクテリア *Gloeobacter violaceus* が有する **PRK** ホモログに関する研究成果も含めて、カルビンサイクルの進化的完成に関する考察を行った。

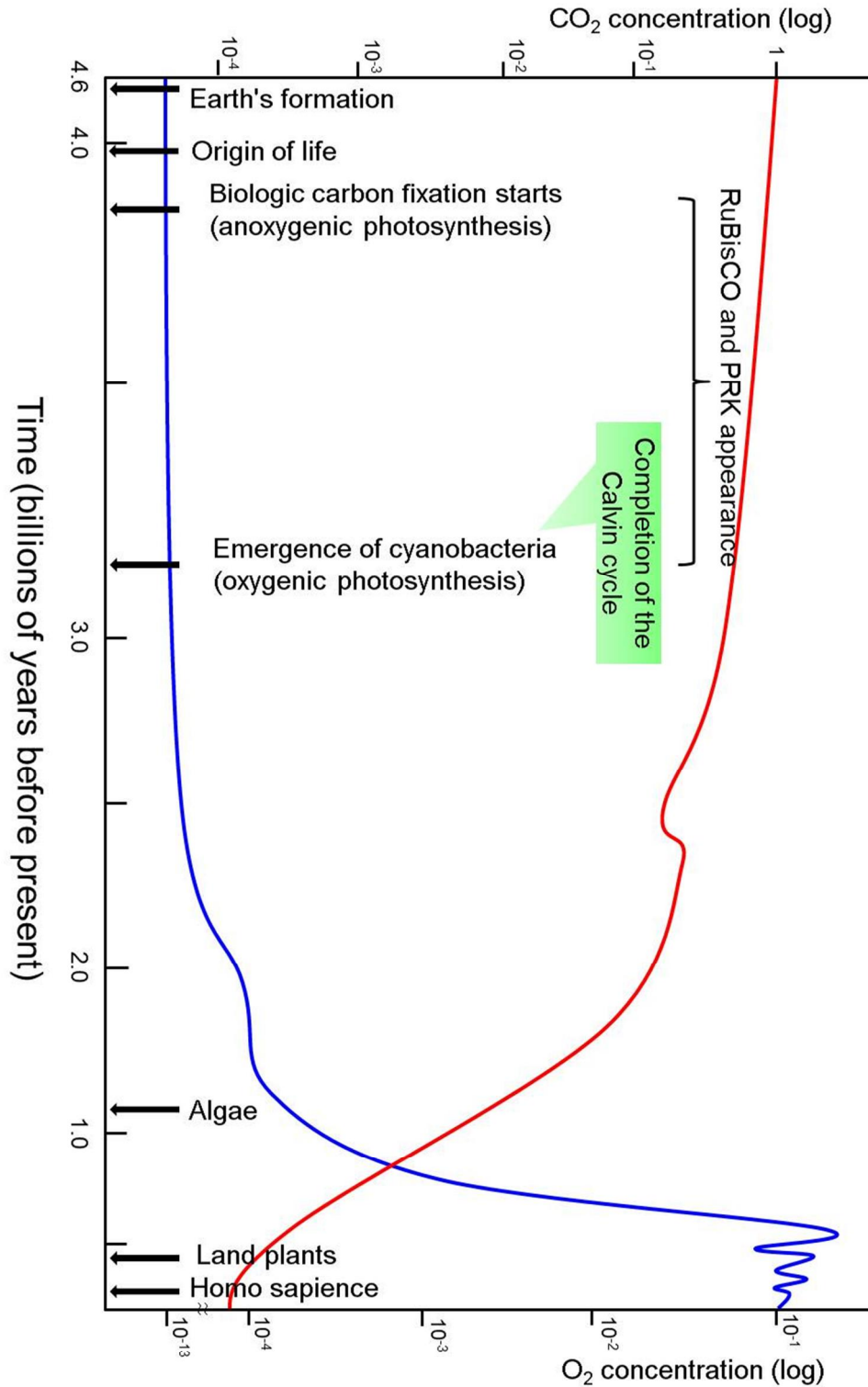


Fig. 1-1 生物進化と地球大気の変遷のモデル

大気中のCO₂濃度 (赤)、O₂濃度 (青)の遷移と、考えられている生物の出現時期、RuBisCOとPRK及びカルビンサイクルの出現時期をまとめた。

(Kasting 2004; Anneberg Learner.org.; Snowball Earth.org.)

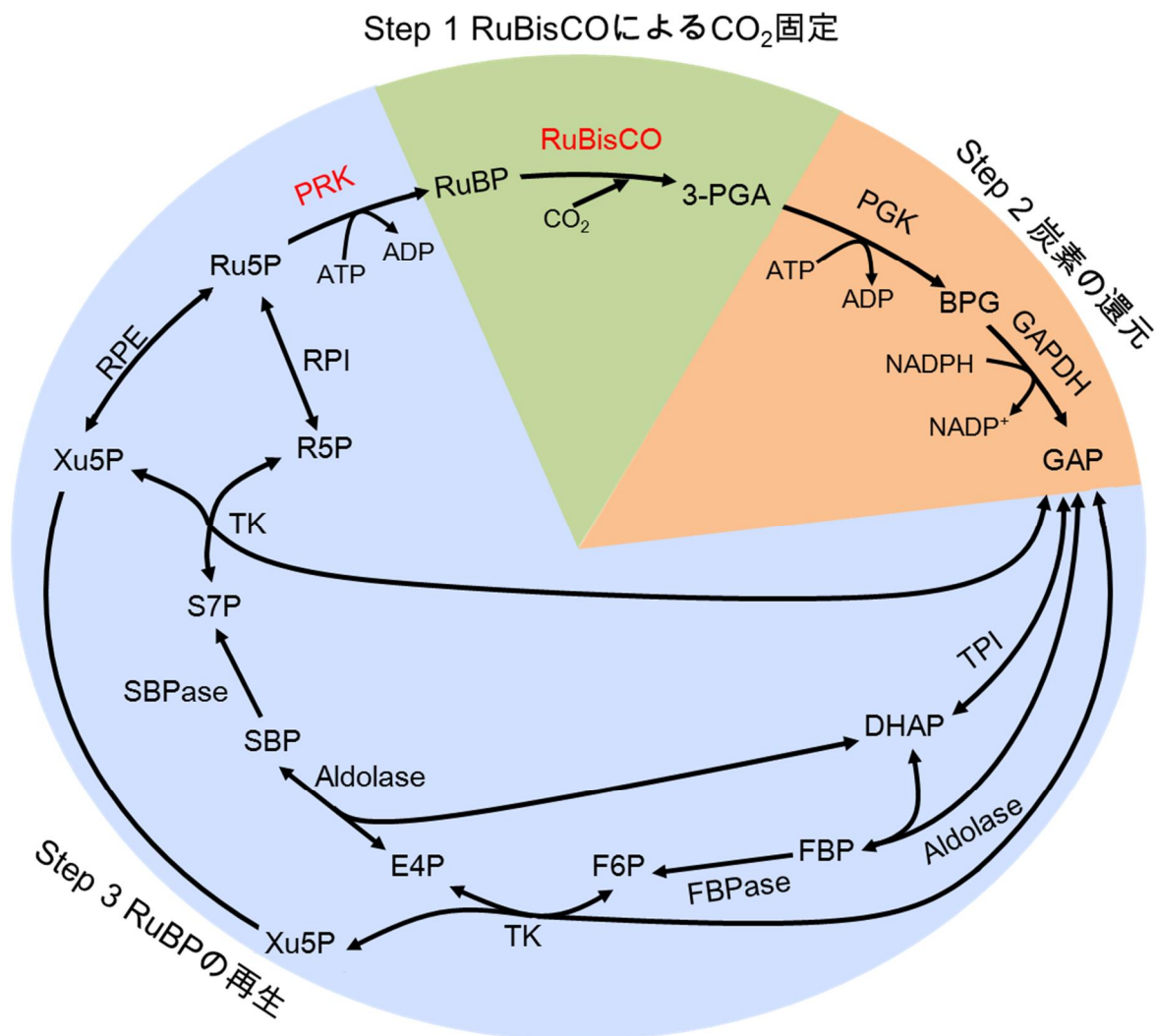


Fig. 1-2 光合成カルビンサイクル

カルビンサイクルは、Step 1: RuBisCO による CO₂ 固定反応 (緑)、Step 2: 固定した炭素の還元 (オレンジ)、Step 3: RuBP の再生 (水色)と、大きく 3 つの反応過程に分けられる。これらは 11 種の酵素によって達成され、特に CO₂ 固定酵素である RuBisCO と、RuBP を合成する PRK がカルビンサイクルに特徴的な鍵酵素だとされている (赤)。

RuBisCO, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase; PGK, 3-phosphoglycerate kinase; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; TPI, triose-phosphate isomerase; FBPase, fructose -1,6-bisphosphatase; SBPase, sedoheptulose-1,7-bisphosphatase; TK, transketolase; RPI, ribose-5-phosphate isomerase; RPE, ribose-5-phosphate 3-epimerase; PRK, phosphoribulokinase; RuBP, ribulose-1,5-bisphosphate; 3-PGA, 3-phosphoglycerate; BPG, 1,3-diphosphoglycerate; GAP, glyceraldehyde-3-phosphate; DHAP, dihydroxyacetone phosphate; FBP,

fructose-1,6-bisphosphate; F6P, fructose-6-phosphate; E4P,
erythrose-4-phosphate; Xu5P, xylulose-5-phosphate; SBP,
sedoheptulose-1,7-bisphosphate; S7P, sedoheptulose-7-phosphate; R5P,
ribose-5-phosphate; Ru5P, ribulose-5-phosphate.

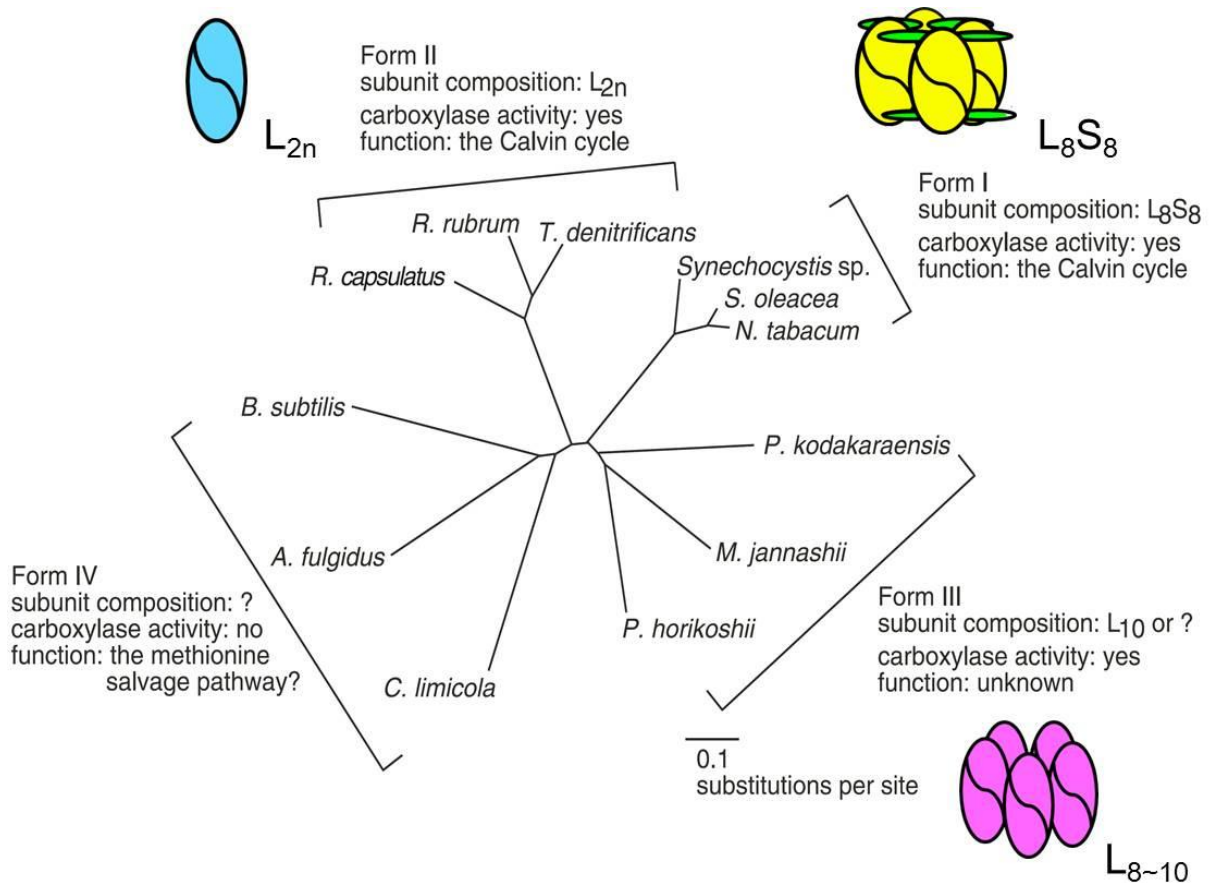


Fig. 1-3 RuBisCO と RuBisCO-like protein (RLP) の系統樹

(Modified from Ashida et al., 2003)

RuBisCO は光合成生物が有する form I (植物、藻類、ラン藻)、form II (バクテリア、一部メタン菌)と、アーキアが有する form III に分類される。Form I はラージサブユニット (L, 黄)とスモールサブユニット (S, 緑)それぞれ 8 個ずつによる L₈S₈ 構造をとる。Form II はラージサブユニットのみの L₂ ダイマーによる L_{2n} 構造をとる (青)。Form III はラージサブユニットのみの L₂ ダイマーによる L_{8~10} 構造をとる (ピンク)。更に RuBisCO としての機能は無いが、RuBisCO の起源だと考えられている RuBisCO-like protein (RLP)、form IV がある。

S. oleracea, *Spinacia oleracea*; *N. tabacum*, *Nicotiana tabacum*;
Synechocystis sp. PCC6803; *R. capsulatus*, *Rhodobacter capsulatus*; *M. jannaschii*, *Methanococcus jannaschii*; *P. horikoshii*, *Pyrococcus horikoshii*; *P. kodakaraensis*, *Pyrococcus kodakaraensis*; *C. limicola*, *Chlorobium limicola*; *A. fulgidus*, *Archaeoglobus fulgidus*.

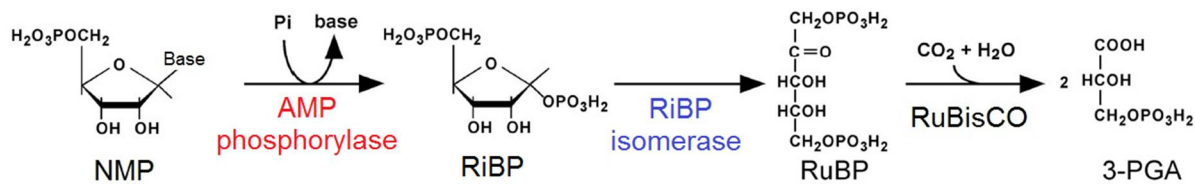


Fig. 1-4 *T. kodakaraensis* において提唱されている Nucleoside monophosphate (NMP) 代謝経路

(Modified from Aono et al., 2012)

T. kodakaraensis をはじめとする多くのアーキアは、そのゲノム上に form III RuBisCO (一部 form II) の遺伝子をコードしている。これらアーキアの RuBisCO は、AMP を含む NMP から phosphorylase 反応 (赤)、isomerase 反応 (青) によって合成された RuBP に炭素固定を行っていることが報告された。このことから、アーキアにおいて RuBisCO は核酸代謝とペントース代謝のリンクに関与すると考えられている。

NMP, nucleoside monophosphate; RiBP, ribose-1,5-bisphosphate.

第 2 章

アーキアにおけるカルビンサイクル酵素ホモログの機能解析

2-1. 序論

生物は現在、真核生物、真正細菌、アーキアの 3 つのドメインに分類されている (Woese et al., 1990; Fig. 2-1)。アーキアは 1674 年に Leeuwenhoek が微生物を発見して以来、その形態が細菌と類似しており、数百年に渡って真正細菌の仲間だと考えられていた。しかし 1977 年、Woese と Fox によって、16S rRNA 配列の解析からアーキアという概念が提唱された (Woese and Fox, 1977; Woese et al., 1990)。また、1978 年にアーキア細胞膜に特異的なエーテル型脂質が発見され、アーキアの細胞膜は例外なく *sn*-glycerol-1-phosphate のイソプレノイドエーテルによって構成されていることが明らかにされた (Makula and Singer, 1978; Tornabene et al., 1978; Koga et al., 1998)。

アーキアは地球上のあらゆる環境に分布している。一般に極限環境と言われる高塩、高熱、強酸といった環境から、水田や湖沼、動物の消化器官などといった非常に広い環境に分布しており、ほとんどは非常に強い嫌気環境が必須であるとされている (Valentine, 2007)。

アーキアが第 3 の生物ドメインであることの裏付けとなった、1996 年の超好熱性メタン菌 *Methanococcus jannaschii* の全ゲノム解読 (Bult et al., 1996) を皮切りに、2017 年 2 月の段階で 700 種を超えるアーキアのゲノムが解読されてきた。その結果、非光合成生物であるアーキアの多くが、そのゲノム上に RuBisCO 遺伝子を有しているという、非常に興味深い情報が明らかとなった。そのアミノ酸配列の系統解析から、これらアーキア型 RuBisCO は、高等植物や藻類、紅藻、シアノバクテリア、光合成細菌の有する form I RuBisCO や、酸素非発生型光合成細菌が有する form II RuBisCO と異なる form III RuBisCO とされた (Ashida et al., 2003; Tabita et al., 2008; Fig. 1-2)。アーキアの有する form III RuBisCO の機能として、NMP を出発基質として合成された RuBP に対し RuBisCO が CO₂ 固定を行うことが超好熱性アーキア *Thermococcus kodakaraensis* において報告された (Sato et al., 2007; Fig. 1-4)。このことから、アーキアにおける RuBisCO は核酸代謝とペントース代謝のリンカーとして機能していると考えられている (Aono et al., 2012, 2015)。

この報告を含め、form III RuBisCO に関する報告はいくつかあったが、PRK を同時に有しているものは報告されておらず、アーキアと光合成カルビンサイクルの関連性は不透明だった (Finn and Tabita, 2004)。

興味深いことに、私はゲノム解読が完了しているアーキアの内、メタン菌 *Methanospirillum hungatei* (Zeikus and Bowen, 1975; Gunsalus et al., 2016) をはじめとする、22 種のアーキアが RuBisCO ホモログ遺伝子と PRK ホモログ遺伝子を同時に有していることを見出した。これまで RuBisCO と PRK を同時に有するアーキアは報告されておらず、これらのホモログ酵素の機能に興味を持たれた。しかしながら、配列相同性やバイオインフォマティクス解析のみから付けられた機能アノテーションと、実際の機能が異なるという報告が増えている。例えば、本研究室において非光合成細菌やアーキアの RuBisCO ホモログタンパク質、RuBisCO-like protein (RLP) が、RuBisCO とは異なる機能を持ち、カルビンサイクルではなく、アミノ酸代謝で働く酵素であることが明らかにされている (Ashida et al., 2003)。そのため、これらメタン菌の RuBisCO、PRK ホモログも実際の機能や、働く経路が異なる可能性が考えられた。

本章ではこれらの点を明らかにするために、*M. hungatei* を主な研究対象とし、*M. hungatei* が有する RuBisCO ホモログ及び、*M. hungatei* を含む 5 種のアーキア (メタン菌 *Methanosaeta thermophila*, *Methanosaeta concilii*, *Methanoculleus marisnigri* 及び、超好熱性アーキア *Archaeoglobus profundus*) 由来の PRK ホモログの大腸菌リコンビナントタンパク質を利用して、生化学的な機能解明を目的として解析した。さらにアーキア型 PRK ホモログと光合成型 PRK の構造比較を行うため、松村浩由博士ら (大阪大学工学研究科) との共同研究として、*M. hungatei* PRK ホモログタンパク質の結晶構造解析を行った。

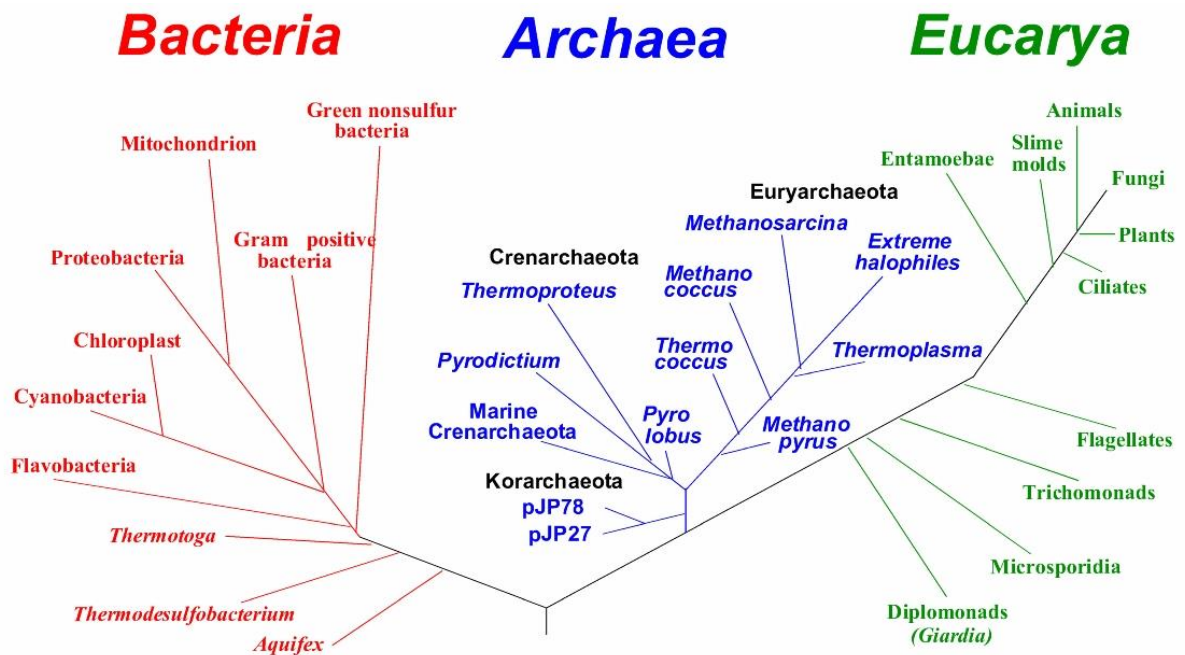


Fig. 2-1 16S/18S rRNA を基にした生物の系統樹
 (Woese et al., 1990; figure from Jurgens 2002)

真正細菌 (bacteria)を赤、アーキア (archaea)を青、真核生物 (eucarya)を緑で、それぞれ分類している。

2-2. 材料と方法

2-2-1. His-tag を付加したリコンビナント PRK 及び RuBisCO ホモログタンパク質の発現系の構築

M. hungatei JF-1 strain (NBRC no. 100397)は、NBRC (Biological Resource Center, NITE)より入手した。Qiagen DNA plant mini kit を用いて、この菌体からゲノム DNA の調製を行った。*M. hungatei* PRK 及び RuBisCO ホモログの遺伝子配列情報は、KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.genome.jp/kegg/>)より入手した。その情報をもとに、以下のプライマーセットを作製した。*M. hungatei* PRK は forward primer に *Xho*I、reverse primer に *Nde*I サイトを、*M. hungatei* RuBisCO は forward primer に *Xho*I、reverse primer に *Bam*HI サイトをそれぞれ付加した。

Primer name	Primer sequence (5'→3')
MhPRK-F	GATCCTGAACCTTCATATGAGTCAGCCTGAAAATTTCCG
MhPRK-R	GCGTATTATTTGAGGTACTCGAGTTATTGATCCAGATGATTGG
MhRuBisCO-F	GCGAGGAAGCTCGAGATGACAGACGTTATTGCAAC
MhRuBisCO-R	GGTATTTCCATGTAGGATCCTTATGCAATTCCCC

M. hungatei のゲノム DNA を鋳型として、作製した各プライマーセットを用いて、PCR を行った。PCR は PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase (Takara Bio Inc., Japan)を用いて行った。熱サイクルプログラムは以下の通りである：変性は 98°C, 10 sec、アニーリングは 55°C, 5 sec、伸長反応は 72°C, 10 sec を 30 サイクル行った。PCR 産物は制限酵素処理(*M. hungatei* PRK へは *Xho*I/*Nde*I、*M. hungatei* RuBisCO へは *Xho*I/*Bam*HI)を行った。PCR 産物と同様に制限酵素処理を行った pET-15b vector (Novagen, USA)を Alkaline phosphatase (Takara Bio Inc., Japan)により脱リン酸化し、Ligation High (TOYOBO, Japan)により連結し、*Escherichia coli* DH5 コンピテントセルを形質転換した。得られたプラスミド pET15b-MhPRK と pET15b-MhRuBisCO を ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Japan)を用いて塩基配列に変異がないことを確認した。これらの得られたプラスミドで、*E. coli* C43 (DE3)コンピテントセルを形質転換し、リコンビナントタンパク質発現株を作製した。

さらに、*M. hungatei* RuBisCO 発現量の改善のために、発現系及び宿主 *E. coli* を変更した。先に作製した pET15b-MhRuBisCO をもとに、pET15b 由来の rbs、His-tag、thrombin 認識配列及び *M. hungatei* RuBisCO の配列を含むように作製した以下のプライマーセットを用いて、PCR を行った。PCR は KOD FX Neo (TOYOBO, Japan)を用いて行った。熱サイクルプログラムは以下の通りである：変性は 98°C, 10 sec、アニーリングは 78°C, 30 sec、伸長反応は 68°C, 90 sec を 40 サイクル行った。

Primer name	Primer sequence (5'→3')
pETtopUC-F	CCATGATTACGAATTCGAAGGAGATATACCATGGG
pETtopUC-R	GCAGGTCGACTCTAGATTTCTGGGCTTTGTTAGCAG

得られた PCR 産物は、*EcoR* I/*Xba* I で制限酵素処理をした pUC18 vector (Takara Bio Inc., Japan)に In-Fusion[®] HD Cloning Kit (Takara Clontech Lab., USA)を用いてクローニングを行った。得られた pUC18-pETMhRuBisCO は受託 DNA シーケンス解析 (Sigma-Aldrich Japan)にて塩基配列に変異がないことを確認した。これらの得られたプラスミドで、*E. coli* JM109 コンピテントセルを形質転換し、リコンビナントタンパク質発現株を作製した。

M. marisnigri JR 1 strain のゲノム DNA は、American Type Culture Collection (ATCC, USA)より入手し (ATCCR no. 35101)、*M. concilii* GP 6 starin (NBRC no.103675)、*M. thermophila* (NBRC no. 101360)及び *A. profundus* (NBRC no.100127)のゲノム DNA は NBRC より入手した。*M. marisnigri* PRK、*M. concilii* PRK、*M. thermophila* PRK、*A. profundus* PRK ホモログの遺伝子配列情報は、KEGG より入手した。その情報をもとに、プライマーを作製した。

Primer name	Primer sequence (5'→3')
MmPRK-F	CAGCCATATGCTCGAGATGCCCCCATCCGAC
MmPRK-R	GTTAGCAGCCGGATCCTCACCTTCGGCCGCA
McPRK-F	CAGCCATATGCTCGAGATGAGATCGCTCAAG
McPRK-R	GTTAGCAGCCGGATCCCTAATAGCCCTCTTC
MtPRK-F	CAGCCATATGCTCGAGATGCGACTTCTCGAG
MtPRK-R	GTTAGCAGCCGGATCCTCACCAGGCGAGATT
ApPRK-F	CAGCCATATGCTCGAGATGCTTAAAGAGAAG
ApPRK-R	GTTAGCAGCCGGATCCCTACAATCTCAAAC

各ゲノム DNA を鋳型として、作製した各プライマーセットを用いて、PCR を行った。PCR は PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase (Takara Bio Inc.)を用いて行った。熱サイクルプログラムは以下の通りである：変性は 98°C, 10 sec、アニーリングは 55°C, 5 sec、伸長反応は 72°C, 1 min を 30 サイクル行った。これによって得られた PCR 産物を、*Bam*H I/*Xho* I で制限酵素処理 (37°C, 4 h)した vector, pET-15b (Novagen)に In-Fusion cloning を行い、*E. coli* DH5 コンピテントセルを形質転換した。なお、In-Fusion cloning は添付のプロトコールに従い、In-Fusion[®] HD Cloning Kit を用いて行った。得られた pET15b-MmPRK、pET15b-McPRK、pET15b-MtPRK、pET15b-ApPRK は ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Japan)を用いて塩基配列に変異がないことを確認した。これらの得られたプラスミドで、*E. coli* C43 (DE3)コンピテントセルを形質転換し、リコンビナントタンパク質発現株を作製した。

2-2-2. リコンビナントタンパク質の発現

各 His-tag 融合リコンビナントタンパク質の発現には *E. coli* C43 (DE3)を用い、50µg/mL ampicillin を含む LB 培地において、37°C で培養したものを用いた。次に、培養液の OD600 が 0.4~0.6 に達すると、終濃度が 1 mM となるように isopropyl -D-thiogalacto- pyranoside (IPTG)を添加して、18°C, 20 h 発現誘導を行った。菌体は遠心、4°C, 3,500 g で回収し、-20°C で保存した。

pUC18-pETMhRuBisCO に限り、発現には *E. coli* JM109 を用い、50 µg/mL ampicillin 及び 0.2 mM IPTG を含む LB 培地において、30°C, 24 h 発現誘導を行った。菌体は 4°C, 3,500 g で遠心回収し、-20°C で保存した。

2-2-3. リコンビナント PRK ホモログの精製

リコンビナントタンパク質は添付のプロトコールに従い、His-Bind resin (Novagen, USA)を用いて精製した。次に、Amicon Ultra-10K membrane (Millipore, USA)を用いて精製タンパク質を遠心濃縮し、Thrombin buffer (20 mM Tris-HCl pH8.0, 150 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂)で

平衡化した PD-10 column (GE Healthcare, Japan)に供し、脱塩及び Buffer 置換をしたタンパク質溶液に対して 2U Thrombin protease (Novagen, USA)を加え、25°C, 4 h の条件で His-tag を切断した。*M. marisnigri* PRK ホモログと *A. profundus* PRK ホモログはゲル濾過クロマトグラフィーを行わず、このタンパク質溶液を用いて酵素学的解析を行った。*M. hungatei* PRK ホモログ、*M. concilii* PRK ホモログ、*M. thermophila* PRK ホモログは次の精製ステップとして、ゲルろ過 Buffer (50 mM Tris-HCl (pH8.0), 0.5 mM EDTA, 100 mM KCl)で平衡化したゲルろ過カラム (Superose 6, 10/300 GL, GE Healthcare, Japan)及び、ÄKTApurifier 10S クロマトグラフィーシステム (GE Healthcare, Japan)を用いて精製を行った。この精製タンパク質を用いて酵素学的解析を行った。

また、ゲルろ過クロマトグラフィーを行った際に、ゲルろ過マーカークット (Gel Filtration Molecular Weight Markers Kit, 200 Sigma-Aldrich)を用いて *M. hungatei* PRK ホモログ、*M. concilii* PRK ホモログ、*M. thermophila* PRK ホモログのホロ酵素の分子質量を解析した。マーカの分子質量と溶出ボリュームから作成した検量線を用い、各 PRK ホモログの溶出ボリュームから算出した。

2-2-4. PRK 活性測定法

PRK 活性は、触媒反応による ADP の生成速度を解糖系酵素とカップリングさせることにより、NADH の減少速度として測定した (Kobayashi et al., 2003 を一部改変)。反応混液 (100 mM Tris-HCl (pH8.0), 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.2 mM NADH, 2 mM ATP, 2.5 mM PEP, 2 mM Ru5P, 5 units/ml LDH (Oriental yeast, Japan), 2 units/ml PK (Oriental yeast, Japan))に精製タンパク質を添加して全量 500 µl とし、25°C に保温した状態で 340 nm の吸光度変化を U3300 spectrophotometer (HITACHI)を用いて測定した。何点か基質濃度を変えて測定を行い、340 nm の吸光度減少の傾きと、NADH の分子吸光係数 $6.22 \times 10^3 \text{ (M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}\text{)}$ を用いて、一分間あたりの ADP 生成量に換算して、精製タンパク質濃度から PRK 活性を算出した。なお、 V_{max} 及び K_m 値は、Lineweaver-Burk の逆数プロットにより算出した。

2-2-5. *M. hungatei* PRK ホモログの反応生成物の解析

M. hungatei PRK ホモログによる Ru5P と ATP からの反応生成物は、以下の手法で調製した。反応混液 (50 mM Phosphate buffer (pH8.0), 10 mM MgCl₂, 2 mM ATP, 2 mM Ru5P) に精製タンパク質を添加して全量 1 ml とし、25°C で 60 min 反応させた。これを Amicon Ultra-3K membrane (Millipore, USA) を用いてタンパク質を除去し、解析サンプルとした。解析は本学バイオ技術補佐員・倉田理恵様のご協力により、以下の設定で質量分析を行った。

Instrument	Q-TOF Ultima AP (Micromass/Waters 社製)
Infurion	nanoflow probe tip (Waters 社製)
Ionization	ESI
Ion mode	negative
Rrange	m/z 50-550 or m/z50-300
Cpillary voltage	1.0kV
MS type	MS or MSMS
Collision energy	Control RuBP: 10, 15 (MS, MS/MS) Sample: 7, 15 (MS, MS/MS)

2-2-6. *M. hungatei* PRK ホモログの他基質への親和性の検証

キナーゼ活性はリン酸供与基質とリン酸受容体基質をそれぞれ変えることで、キナーゼ活性の有無を検証した。光合成 PRK の基質である Ru5P の代わりに、6 mM pantothenate, 2 mM thymidine, 2 mM uridine, 2 mM cytidine, 2 mM ribosylnicotinamide, 2 mM AMP, 2 mM fructose-6-phosphate (F6P), 2 mM ribose-5-phosphate (R5P) をそれぞれ用いて測定を行った。

また、ATP 以外の Nucleoside triphosphate (NTP) をリン酸基供与体として利用できるか検証するために、通常 2 mM ATP を基質としているところを、2 mM CTP, 2 mM UTP, 2 mM GTP に置き換えて測定を行った。

2-2-7. アーキア型 PRK 活性に対する光合成 PRK の inhibitor/activator の影響

植物型 PRK の activator (還元剤)として DTT (終濃度 10 mM)及び、inhibitor (酸化剤)として DTNB (終濃度 50 μ M)を用い、それぞれと 30 min インキュベートしたものをを用いて、測定を行った。またバクテリア型 PRK の inhibitor である 6-phosphocluconate (6PG)と AMP は、それぞれ 10 mM、1 mM の終濃度で測定キュベット内に添加し、測定を行った。測定法及びその他の物質は 2-2-6 に準ずる。影響の評価は、未処理時の活性値を 100%としてそれぞれの物質で処理した際の活性値を算出し、光合成 PRK で見られた影響と比較した。

2-2-8. *M. hungatei* PRK の結晶構造解析

M. hungatei PRK の結晶構造解析は、松村浩由博士、木津奈都子さんから (大阪大学工学研究科) との共同研究として行った。以下に、木津奈都子さん修士論文 (2013)より引用した実験手法を記す。

M. hungatei PRK の培養と精製は、2-2-3 の手法でタンパク質精製を行い、VIVASPIN20 MWCO30000 (sartorius stedim)を用いて濃縮した後、結晶化用ゲルろ過 Buffer (20 mM Tris-HCl pH8.0、150 mM NaCl)で平衡化した HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade (GE Healthcare, Japan)に添加し、溶出した。得られた *M. hungatei* PRK 画分を VIVASPIN20 MWCO30000 で 10 mg/mL まで濃縮し、液体窒素を用いて瞬間冷凍し、-80°C で保存した。

X 線結晶構造解析における初期位相決定には、セレノメチオニン (SeMet)標識タンパク質を用いた。SeMet 標識 *M. hungatei* PRK の培養と精製は、メチオニン要求株である *E. coli* B834 (DE3)と以下の SeMet 用培地を用い、2-2-2 と同様に発現させた。精製方法は上記 *M. hungatei* PRK の精製に準ずる。

SeMet 用培地(1 L あたり)

(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0 g
KH ₂ PO ₄	4.5 g
K ₂ HPO ₄	10.5 g
Sodium Citrate	0.5 g
1 M MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.0 mg
Glucose	5.0 g
Met 以外のアミノ酸(19 種)	各 40 mg
核酸(4 種)	各 0.5 g
SeMet	40 mg
Thiamine	2.0 mg

M. hungatei PRK の結晶化と X 線回折実験は、10 mg/ml *M. hungatei* PRK 及び 10 mg/ml SeMet 標識 *M. hungatei* PRK を用いて、それぞれ 0.2 M Lithium sulfate monohydrate (HAMPTON), 0.1 M HEPES sodium pH7.8 (HAMPTON), 20% (w/v) Polyethelene glycol 4000 (HAMPTON)の条件、1.5 M Ammonium sulfate, 12% (v/v) Glycerol (HAMPTON), 0.1 M Tris-HCl pH8.5 (HAMPTON)の条件で、ハンギングドロップ蒸気拡散法にて 20°C で、振盪しながら結晶化を行った。クライオプロテクトANTはそれぞれ 10% Ethylen glycol (HAMPTON)、20% Glycerol (HAMPTON)を用いて 100 K の窒素ガス気流下で瞬間凍結した。X 線回折実験は、どちらも大型放射光施設 SPring-8 BL44XU にて行った。プログラム *HKL2000* にて回折強度データの処理を行った。

位相決定は単波長異常分散法 (SAD 法)にて行い、解析ソフトにはプログラム *SHELXD*、*SHELXE*、*HKL2MAP* を用いた。初期構造の精密化はプログラム *CNS* による *rigid.inp*、*minimize.inp*、*bindividual.inp*、プログラム *COOT* によるモデル構築を繰り返した。最終的に結晶学的信頼度因子 R 値 22.2% で構造精密化を終了した (木津奈都子 2013)。

2-2-9. *M. hungatei* RuBisCO ホモログの精製

pUC18 発現系による *M. hungatei* RuBisCO ホモログのリコンビナントタンパク質は、His60 Ni Superflow Cartridge (5 mL) (Takara Clontech Lab., USA)及び、ÄKTApurifier 10S クロマトグラフィーシステム (GE Healthcare, Japan)を用いて精製を行った。次に、Thrombin buffer で平衡化した PD-10 column (GE Healthcare)に供し、脱塩及び Buffer 置換をした。これを Amicon Ultra 6 0.5mL (3K) (Millipore)を用いてタンパク質を遠心濃縮し、得られたタンパク質溶液に対して 1U Thrombin protease (Novagen)を加え、25°C, 12 h の条件で His-tag を切断した。Native-PAGE は 10-20% Gradient 既製ゲル (ATTA, e-PAGELE-T1020L)を用い、4°C, 24 mA, 120 min 泳動を行った。マーカーとして Amersham HMW Native Marker Kit (GE Healthcare, Japan)及び、当研究室で得られた他生物由来の RuBisCO を用いた。

2-2-10. RuBisCO carboxylase 活性測定法

RuBisCO の carboxylase 活性を測定する際、活性測定に用いる全ての溶液、試薬に存在する O₂ と CO₂ を N₂ に置換する為、活性測定に用いる Buffer (200 mM HEPES-KOH pH8.0, 20 mM MgCl₂)を 30 min, N₂ ガス (>99.99%, Iwatani, Japan)で置換し、また、各種試薬も Buffer と同様に N₂ ガス置換し、N₂ ガス置換した Buffer に溶解させた。また、測定に用いるスクリーキャップ付き密閉型キュベット内も N₂ ガス置換を行い、シリンジを用いて溶液を注入することで、外的持ち込みの O₂ 及び CO₂ の混入を防いだ。

RuBisCO の carboxylase 活性は、触媒反応による 3-PGA の生成速度を、カップリング酵素の反応による NADH の減少速度をモニタリングすることにより測定した (Schloss et al., 1982; Pearce and Andrews 2003 を一部改変)。反応混液 (200 mM HEPES-KOH (pH8.0), 20 mM MgCl₂, 0.2 mM NADH, 5 mM ATP, 20 mM CP, 50 mM NaHCO₃, 2 mM RuBP, 22.5 units/ml PGK (Sigma-Aldrich, USA), 20 units/ml GAPDH (Sigma-Aldrich), 25 units/ml CP kinase (Oriental yeast), 0.1 mg/ml Carbonic anhydrase (Sigma-Aldrich), 0.1 units/ml Protocatechuate 3,4-dioxygenase (TOYOBO, Japan), 4 mM protocatechuate)に精製タンパク質を添加して全量 500 µl

とし、25°Cに保温した状態で 340 nm の吸光度変化を U3300 spectrophotometer (HITACHI)を用いて測定した。340 nm の減少の傾きと、NADH の分子吸光係数 $6.22 \times 10^3 \text{ (M}^{-1} \times \text{cm}^{-1})$ を用いて、一分間あたりの GAP 生成量に換算して、精製タンパク質濃度から carboxylase 活性を算出した。

また、RuBisCO の阻害剤である 2-carboxy-D-arbinotol-1,5-bisphosphate (CABP)処理は、終濃度 0.6 mM CABP 存在下で 30°C、10 min インキュベーションした後に、RuBisCO carboxylase 活性を測定した。

2-2-11. RuBisCO Relative Specificity(S_{rel})の測定

RuBisCO の carboxylase/oxygenase 反応特異性係数、Relative Specificity (S_{rel})は、Eq.(1)により算出され、生物によって異なる (Tcherkez et al., 2006)。

$$S_{rel} = \frac{[V_{max}(\text{CO}_2)/K_m(\text{CO}_2)]}{[V_{max}(\text{O}_2)/K_m(\text{O}_2)]} \quad (1)$$

M. hungatei RuBisCO の S_{rel} 値は、植村らの行った手法をもとに測定、算出した (Uemura et al., 1996 を一部改変)。植村らの考案した 5 mL 特殊形状フラスコ (サイドアーム及びスクリュウキャップを付与)中に、1 mL 反応系 (25 mM Bicine-KOH pH8.3, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM 6-Phosphogluconate, 1mg of carbonic anhydrase and 100~150 µg of *M. hungatei* RuBisCO)及び、反応系と接触しないようサイドアームに 10 mM RuBP を 10 µL 加え、ゴム栓付スクリュウキャップで密閉した。市販の圧縮空気 (21% O₂, 316ppm CO₂)を 300 mL/min で密閉したフラスコ内に流し続け、ウォーターインキュベーター中で 25°C, 80 rpm, 1 h 振とうし、溶存 CO₂ 濃度の平衡化を行った。その後フラスコを転倒し、サイドアーム内の RuBP と反応系とを混和させ、同様に空気を流したまま 25°C, 80 rpm, 2 h 振とうさせ、反応を行った。反応後、20 µL の洗浄済み DOWEX[®] 50Wx8 100-200 (H⁺ form) (Wako, Japan)を加えて反応液中の Mg²⁺を除去し、Amicon Ultra 6 0.5mL (3K) (Millipore)を用いてタンパク質を除去したものを、測定サンプルとした。測定には Dionex ICS-2100 陰イオン交換クロマトグラフィーシステム (ThermoFisher

Scientific, Japan)及び AS11-HC カラム、溶離液として 30 mM KOH を用い、反応生成物を電気伝導度のピークによって検出した。装置のコントロール及びピークエリアの解析には Chromeleon 7 Chromatography Data System (ThermoFisher Scientific)を利用した。

得られたピークエリアの結果から、植村らの考案した数式 Eq.(2)によって、 S_{rel} 値を算出した。

$$S_{rel} = (3\text{-PGA}^* - \text{PGO}^*)/2/\text{PGO}^* \times [\text{O}_2]/[\text{CO}_2] \times 0.0375 \quad (2)$$

3-PGA* 及び PGO* はそれぞれ得られたピークエリアの面積を意味する。0.0375 は、水相中における CO₂/O₂ の溶解度の比として用いた。

2-3. 結果

2-3-1. 大腸菌におけるアーキア PRK ホモログの発現と精製

アーキア PRK ホモログの機能を解析するために、大腸菌で His-tag 付加リコンビナントタンパク質として発現させた。大腸菌での発現は、18°Cで行った。*M. hungatei* PRK ホモログの His-Bind resin による精製画分、Thrombin protease 処理後、ゲルろ過クロマトグラフィー精製画分を SDS-PAGE により解析した。その結果、最終的なゲルろ過クロマトグラフィー精製画分は、CBB 染色レベルで夾雑タンパク質は存在しておらず、His-tag 切断した目的タンパク質の精製に成功した (Fig. 2-2 a)。同様に、*M. concilii* (Fig. 2-2 b)、*M. thermophila* (Fig. 2-2 c)、*M. marisnigri* (Fig. 2-2 d)の PRK ホモログも精製に成功した。*A. profundus* の PRK は発現量が非常に低く、精製タンパク質においても若干の夾雑バンドが見られた (Fig. 2-2 e)。

ゲルろ過クロマトグラフィー精製の際に、それぞれのホロ酵素分子質量を算出したところ、*M. hungatei* PRK ホモログは 80 kDa でホモダイマー、*M. concilii* PRK ホモログは 149 kDa、*M. thermophila* PRK ホモログは 130 kDa で、共にホモテトラマーであることが予想された (Fig. 2-3)。

2-3-2. アーキア PRK ホモログの PRK 活性測定

精製した *M. hungatei* PRK ホモログについて、PRK としての酵素学的解析として、Ru5P または ATP に対する K_m 及び、 V_{max} の測定を行った。その結果、 $V_{max} = 29.17 \pm 0.55 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ 、 $K_{m(\text{Ru5P})} = 0.28 \pm 0.02 \text{ mM}$ 、 $K_{m(\text{ATP})} = 12.37 \pm 0.39 \mu\text{M}$ であった (Fig. 2-4; Table 2-1)。また、*M. hungatei* 以外のアーキアが持つ PRK ホモログもアーキア型 PRK であると予想し、他 4 種のアーキア PRK ホモログも同様に酵素学的解析を行った。その結果、*M. concilii* PRK ホモログは $V_{max} = 43.84 \pm 2.84 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ 、 $K_{m(\text{Ru5P})} = 0.31 \pm 0.08 \text{ mM}$ 、 $K_{m(\text{ATP})} = 17.91 \pm 2.02 \mu\text{M}$ 、*M. thermophila* PRK ホモログは $V_{max} = 19.10 \pm 0.59 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ 、 $K_{m(\text{Ru5P})} = 0.23 \pm 0.05 \text{ mM}$ 、 $K_{m(\text{ATP})} = 5.66 \pm 0.21 \mu\text{M}$ であった。さらに、*M. marisnigri* PRK ホモログと *A. profundus* PRK ホモログ

はそれぞれ $36.77 \pm 3.09 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ 、 $1.68 \pm 0.06 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ の specific activity を示した (遠藤千夏子 2013; Table 2-1)。

2-3-3. *M. hungatei* PRK ホモログの反応生成物の解析

さらに *M. hungatei* PRK ホモログの Ru5P と ATP からの反応生成物が、光合成 PRK と同様に RuBP であるか検証するために、反応生成物の質量分析を行った。その結果、MS 解析によって RuBP に相当する 309 m/z のピークが観察された。酵素を添加していないネガティブコントロールでは、このピークは見られず、*M. hungatei* PRK ホモログの反応由来であると判断した (Fig. 2-5 a, c, e, f)。また、309 m/z のピークを更に MS/MS 解析したところ、211 m/z、193 m/z、139 m/z、96.9 m/z のピークが観察され、フラグメンテーションパターンがコントロールの市販されている RuBP のものと一致した (Fig. 2-5 b, d)。これらの結果から *M. hungatei* PRK の Ru5P と ATP からの反応産物は RuBP であり、アーキア型 PRK は、真の PRK であることが証明された。そのため、以降はアーキア PRK ホモログをアーキア型 PRK として扱った。

2-3-4. *M. hungatei* PRK の基質特異性

PRK は panthotenate kinase、uridine kinase などを含む P-loop NTPase (nucleoside triphosphatase) superfamily 及び、P-loop kinase family に属している。P-loop kinase family に属する酵素はアデニル酸 (Adenylate kinase) やヌクレオシド 1-リン酸 (Nucleoside monophosphate kinase) など、様々な基質をリン酸化し、多様な細胞機能に関与することが知られている (Leipe et al., 2003)。P-loop kinase family は共通して Walker らによって提唱された P-loop (Walker motif A) を含んでいる (Walker et al., 1982)。P-loop は öGXXXXGKT/Sö をコンセンサス配列に持ち、NTP のリン酸基と結合する。

これまで唯一構造が明らかにされていたバクテリア型である *R. spaeroides* PRK は、アミノ酸配列、立体構造的にも同じ P-loop kinase family の uridine/cytidine kinase や pantothenate kinase、adenylate kinase と相同性を示すことが報告されている (Suzuki et al., 2004)。更に、アーキア型 PRK は PRK としてだけでなく、uridine/cytidine kinase とアノ

テーションされている。そのため、アーキア PRK が uridine/cytidine を始めとした Ru5P 以外の P-loop kinase family の基質を認識し、キナーゼ反応を触媒しうるのかを調べた。特に PRK と相同性を示す P-loop kinase family 酵素のリン酸化基質、AMP、pantothenate、thymidine、uridine、cytidine、ribosylnicotinamide、F6P 及び ribose 5-phosphate を用いて解析した。その結果、*M. hungatei* PRK は Ru5P に対してのみ触媒能を示し、それ以外の基質に対して全く触媒能を示さなかった (Table 2-2)。この結果から、アーキア型 PRK は Ru5P を特異的にリン酸化基質として用いることが示唆された。

さらに、*M. hungatei* PRK が ATP 以外の NTP もリン酸基供与体として利用できるのか検証した。植物型 PRK は他の NTP では ATP 利用時の 5% 以下の活性しか示さない (Hurwitz et al., 1956)。また、バクテリア型 PRK は GTP だと 12.6%、UTP だと 37.5% の活性を示すが、CTP だと活性を示さない (Siebert et al., 1981)。これらに対し、*M. hungatei* PRK は ATP 以外の NTP もリン酸基供与体として利用できることが明らかになった (Fig. 2-6)。特に GTP 利用時には、通常の ATP 利用時の 94% と、ほぼ同程度の活性値を示した。

2-3-5. アーキア型 PRK 活性に対する光合成 PRK の inhibitor/activator の影響

これまでの結果からアーキア型 PRK の存在を明らかにした。次に、アーキア型 PRK の活性がこれまで報告されている光合成 PRK の inhibitor 及び activator による影響を受け得るのか、*M. hugnatei* PRK を用いて検証した。植物型 PRK は DTT によって 100% の活性化を受け (Geck and Hartman, 2000)、DTNB によって完全な不活性化を受けることが報告されている (Kobayashi et al., 2003)。また、バクテリア型 PRK は 6PG で 78% の不活性化 (Runquist et al., 1999)、AMP によって 95% の不活性化を受けることが報告されている (Abdelal and Schlegel, 1974)。これらに対し *M. hungatei* PRK は、植物型 PRK に代表されるレドックスレギュレーション (DTT, DTNB)、バクテリア型 PRK に代表される代謝産物 (6PG, AMP) による活性制御のどちらからも顕著な影響を受けないことが示唆された (Fig. 2-7)。

2-3-6. *M. hungatei* PRK の結晶構造解析

大阪大学の松村浩由博士らとの共同研究として、*M. hungatei* PRK の結晶構造解析を進めてきた。その成果として、*M. hungatei* PRK の結晶化に成功し、立体構造を解明した (Table 2-3; Fig.2-8 a)。その結果から、*M. hungatei* PRK の構造を植物型 PRK (*Synechococcus elongates* PCC7942, Matsumura et al., unpublished)、バクテリア型 PRK (*Rhodobacter sphaeroides*, PDB: 1A7J, Harrison et al., 1998)と比較すると、アミノ酸配列相同性はどちらも30%程度と低いものの、単量体構造は類似していた。2つのタンパク質の立体構造を重ね合わせた際のズレを表す指標である RMSD (Root Mean Square Deviation)は、植物型とは 3.42 Å for 266 atoms だったのに対し、バクテリア型とは 4.11 Å for 203 atoms だった (Fig.2-8 b, c)。

M. hungatei PRK のプロトマーは8本のシート (1~6, 8~9)によって構成されるコアを、いくつかのヘリックス (1~9)とストランド (1 α , 2 α , 7)が囲った構造を取っている (Fig. 2-8 a, 2-10 a)。このようなプロトマー構造は、アミノ酸配列の相同性が低いにもかかわらず、バクテリア型 PRK 及び植物型 PRK とともに非常に似ていることが明らかになった (Fig. 2-8)。また、*M. hungatei* PRK は7と8を介して二量体界面を形成しており (Fig. 2-10 a)、植物型 PRK は7のみを介して二量体を形成している (Fig. 2-10 b)。これによって、どちらも光学異性体のような二量体形成様式をとり、両者間での二量体形成様式は非常に似ていると言える (Fig. 2-9 a-d)。一方でバクテリア型 PRK は5~6間と5~6間のランダムコイルが二量体形成に関与し、植物型 PRK と *M. hungatei* PRK の二量体界面に該当する8は八量体形成に関与するとされ、バクテリア型 PRK と植物型 PRK 及びアーキア型 PRK 間では、ホロ酵素の形成様式が全く異なる (Harrison et al., 1998; Fig. 2-9 e-g, 2-10 c)。これらの RMSD と二量体形成様式の結果から、アーキア型 PRK はバクテリア型 PRK よりも、植物型 PRK に近いことが示唆された。

植物型 PRK において、P-loop と Trp 140、Arg 144、Pro 298 が ATP アナログの AMP-PNP (ANP)のリン酸基と相互作用している (Fig. 2-11 b, 青枠)。それに対し、*M. hungatei* PRK では P-loop と Trp 150、Arg 154、Asn208、Tyr 210 が ATP のリン酸基に相当する硫酸イオンと相互作用している (Fig. 2-11 a, 青枠)。植物型 PRK における Pro 298 は存在せず、代わりに Asp208、Tyr 210 が相互作用していることが予想された。こ

のことから、*M. hungatei* PRK と植物型 PRK における ATP 結合様式はほぼ一致していると言える。

また、植物型 PRK で Ru5P のリン酸基と相互作用している Arg 49、Arg 52、Tyr 88、His 90 (Fig. 2-11 b, 赤枠)は、*M. hungatei* PRK において Ru5P のリン酸基に相当する硫酸イオンと相互作用している Arg 59、Arg 62、Tyr 98、His 100 に対応し (Fig. 2-11 a, 赤枠)、Ru5P の認識と結合様式は植物型 PRK と *M. hungatei* PRK で一致することが示唆される。Ru5P に対する親和性が植物型 PRK とアーキア型 PRK で大差無いのは、これらの保存されたアミノ酸残基に起因することが予想された。

植物型 PRK のレドックスレギュレーションに関与する Cys 18、Cys 40 は、構造的にもアミノ酸配列上でも *M. hungatei* PRK の Ser 28 及び Thr 50 に置換されており、Cys 残基を保存していない。これらの事実と 2-3-5 で活性に対する DTT と DTNB の影響が見られなかったことから (Fig. 2-7)、アーキア型 PRK は植物型 PRK のようなレドックスレギュレーションは受けないと考えられる。

2-3-7. 大腸菌における *M. hungatei* RuBisCO ホモログの発現と精製

M. hungatei RuBisCO ホモログの機能を解析するために、大腸菌で His-tag 付加リコンビナントタンパク質として発現させた。大腸菌での発現は、30°Cで行った。大腸菌より抽出した可溶性画分、His-Bind resin による精製画分、及び Thrombin protease 処理後の画分を用い、SDS-PAGE により精製の確認を行った。その結果、Thrombin protease 処理後の画分は、CBB 染色レベルで夾雑タンパク質は存在しておらず、His-tag 切断した目的タンパク質の精製に成功した。*M. hungatei* RuBisCO ホモログは pET15b 発現系では大腸菌リコンビナントタンパク質として非常に発現量が低く、また、非常に不溶化しやすかった (Fig. 2-12 a)。そのため、pET15b vector 由来の His₆-tag 配列を含めて pUC18 vector に挿入し、宿主大腸菌を JM109 菌株とすることで、発現量と可溶化効率の向上が見られたため、以降の実験では pUC18 発現系から得られた精製タンパク質を用いて行った (Fig. 2-12 b)。

Native-PAGE の結果、マーカーの 66 kDa と *Rhodospirillum rubrum* RuBisCO (112 kDa)の間に *M. hungatei* RuBisCO のバンドが検出された

(Fig. 2-13)。 *M. hungatei* RuBisCO のサブユニットが約 43 kDa であることから、 *M. hungatei* RuBisCO のホロ酵素はホモダイマーであることが強く示唆された。 これまでに報告されているメタン菌の form III RuBisCO もホモダイマーであり (Finn and Tabita, 2003)、 RuBisCO としての基本的なダイマー構造が保存されていると考えられる。

2-3-8. *M. hungatei* RuBisCO ホモログの carboxylase 活性測定

精製した *M. hungatei* RuBisCO ホモログについて、 RuBisCO としての触媒反応の有無を確かめるために、 carboxylase 活性測定を行った。 その結果、 *M. hungatei* RuBisCO ホモログは $0.169 \pm 0.004 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein の carboxylase 活性を示した。 そのため、以降は *M. hungatei* RuBisCO として扱う (Table 2-4)。

加えて、 RuBisCO に特徴的な阻害剤である 2-carboxy-D-arbinotol-1,5-bisphosphate (CABP) を利用することで、 *M. hungatei* RuBisCO が RuBisCO であるか再確認した。 CABP は RuBisCO のカルボキシラーゼ反応の反応中間遷移アナログで、活性中心に 10^{-11} M という極めて低い K_D で結合する非常に強力な阻害剤である (Pierce et al., 1980)。 不活性化に十分量である終濃度 0.6 mM CABP 存在下で処理した *M. hungatei* RuBisCO を用いて活性測定を行った結果、 carboxylase 活性を示さず、 CABP によって不活性化されていた (Table 2-4)。 これは、 *M. hungatei* RuBisCO が RuBisCO であるという証明と同時に、光合成 RuBisCO と同様の触媒メカニズムであることを強く示唆している。

2-3-9. *M. hungatei* RuBisCO の S_{rel} 測定

測定の結果、 *M. hungatei* RuBisCO の S_{rel} 値は 1.94 ± 0.31 だった (Table 2-5)。 この値はこれまでに報告されている他生物 RuBisCO の S_{rel} 値の中でも非常に低く、通常大気条件ではほぼ oxygenase 反応のみ進行することになり、ほとんど carboxylase 反応をしないことになる。 これはアーキアや光合成細菌などの嫌気性生物が有する RuBisCO に共通してみられる特徴であり、本来の生育環境では oxygenase 反応が起こりえないことが起因していると考えられる。

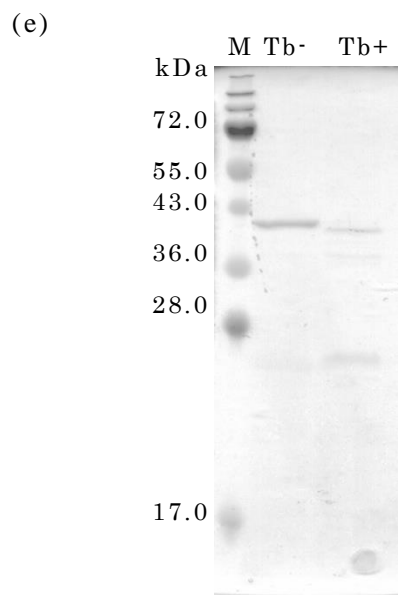
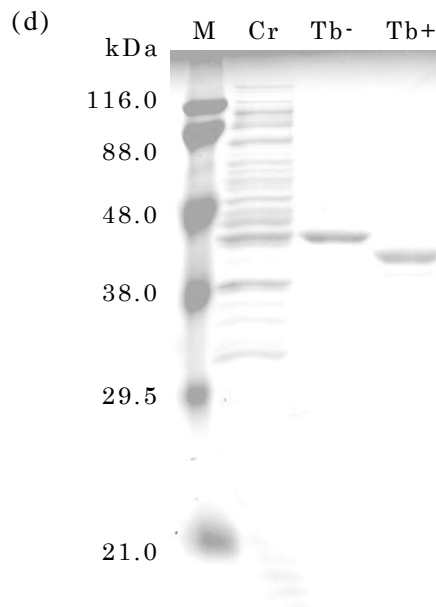
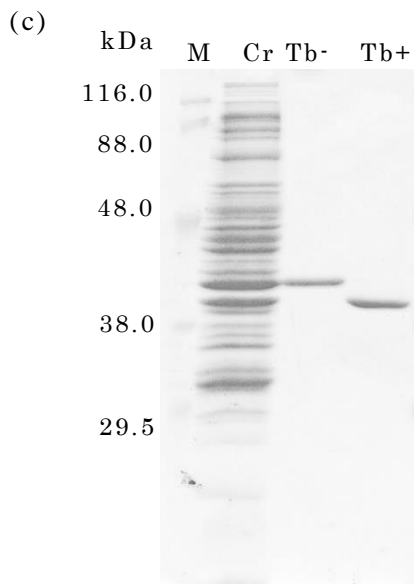
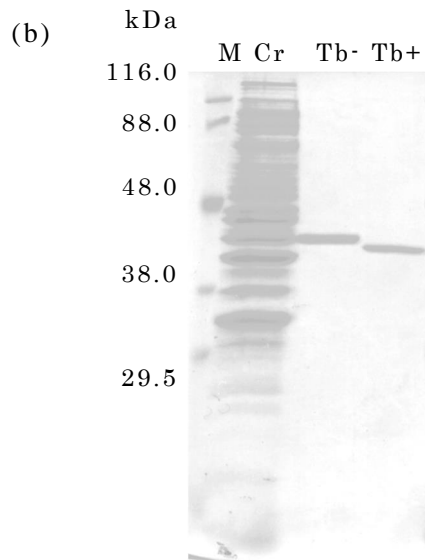
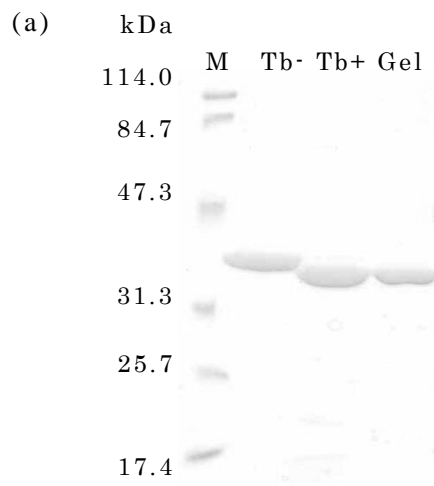


Fig. 2-2 アーキア PRK ホモログの精製

各 PRK ホモログの精製を SDS-PAGE で確認した。各レーンはそれぞれ、M: マーカー、Cr: 粗酵素タンパク質 (5 $\mu\text{g}/\text{lane}$)、Tb-: Thrombine 未処理 (1 $\mu\text{g}/\text{lane}$)、Tb+: Thrombine 処理後 (1 $\mu\text{g}/\text{lane}$)、Gel: ゲルろ過クロマトグラフィー後 (1 $\mu\text{g}/\text{lane}$)を示す。

(a) *M. hungatei* PRK ホモログ。なお、*M. hungatei* PRK ホモログの分子質量は、37.5 kDa である。

(b) *M. concilii* PRK ホモログ。なお、*M. concilii* PRK ホモログの分子質量は 37.5 kDa である。

(c) *M. thermophila* PRK ホモログの精製。なお、*M. concilii* PRK ホモログの分子質量は 37.8 kDa である。

(d) *M. marisnigri* PRK ホモログ。なお、*M. marisnigri* PRK ホモログの分子質量は 38.3 kDa である。

(e) *A. profundus* PRK ホモログ。なお、*A. profundus* PRK ホモログの分子質量は 37.1 kDa である。

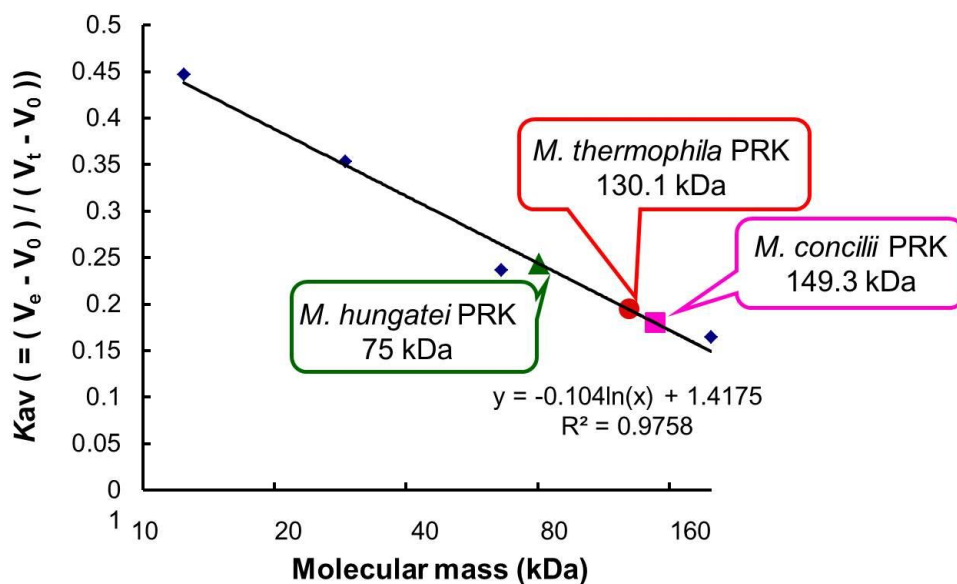


Fig. 2-3 ゲルろ過クロマトグラフィーを用いた分子質量の解析

ゲルろ過クロマトグラフィーにおける分子質量マーカーの溶出ボリュームを用いて検量線を作成し、ゲルろ過クロマトグラフィー精製を行った3種のアーキア PRK ホモログに関して、ホロ酵素の分子質量を算出した。

縦軸に K_{av} 、横軸に各タンパク質の分子質量をプロットし、近似曲線を作成して検量線とした。

V_o : Void Volume = 7.86

V_t : Vet Volume = 24

V_e : Elution Volume =

protein	V_e	Da
Cytochrome c	15.07	12400
Carbonic Anhydrase	13.56	29000
Albumin	11.67	66000
B-Amylase	10.52	200000
Blue Dextran (V_o)	7.86	2000000
<i>M. hungatei</i>	11.79	80772
<i>M. concilii</i>	10.76	149282
<i>M. thermophila</i>	10.99	130149

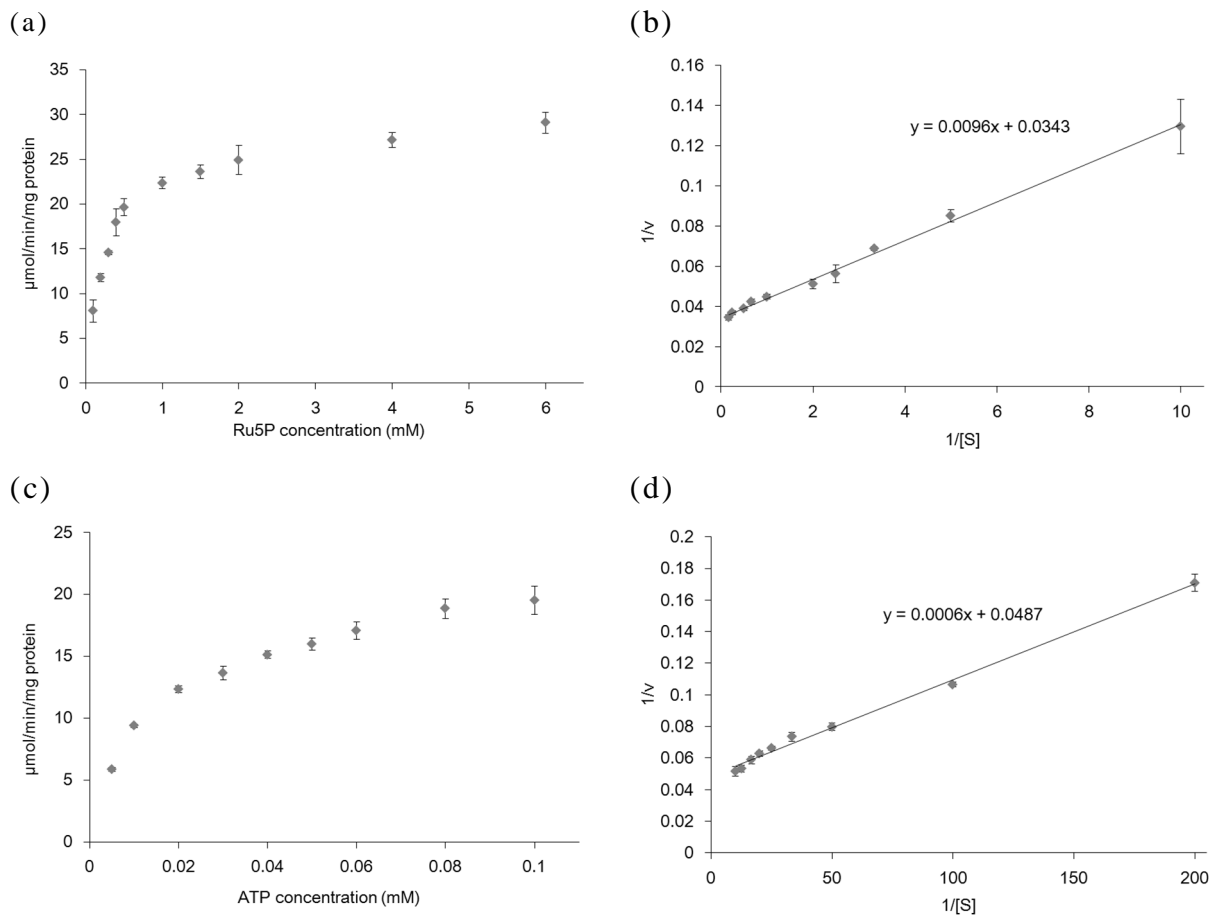


Fig. 2-4 *M. hungatei* PRK の酵素学的解析

M. hungatei PRK の酵素学的パラメータを決定するために、酵素学的解析を行った。

基質である(a) Ru5P と(c) ATP の濃度をそれぞれ変え、反応速度に対してプロットした。それぞれの値は独立した3回の実験の平均値 \pm SDを示す。

最大反応速度 (V_{\max})及び(b) Ru5P, (d) ATP に対する K_m 値は、Lineweaver-Burk の逆数プロットにより、算出した。

Table 2-1 アーキア型 PRK と光合成生物 PRK の酵素学的パラメータの比較

Species	V_{\max} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$)	$K_{m(\text{Ru5P})}$ (mM)	$K_{m(\text{ATP})}$ (μM)
<i>M. hungatei</i> (Archaeon)	29.17 \pm 0.55	0.28 \pm 0.02	12.37 \pm 0.39
<i>M. marisnigri</i> (Archaeon)	36.77 \pm 3.09 ^{*1, 2}	N.T.	N.T.
<i>M. thermophila</i> (Archaeon)	19.10 \pm 0.59 ^{*2}	0.23 \pm 0.05 ^{*2}	5.66 \pm 0.21 ^{*2}
<i>M. concilii</i> (Archaeon)	43.84 \pm 2.84 ^{*2}	0.31 \pm 0.08 ^{*2}	17.91 \pm 2.02 ^{*2}
<i>A. profundus</i> (Archaeon)	1.68 \pm 0.06 ^{*1, 2}	N.T.	N.T.
<i>S. oleracea</i> (Plant)	410 ^{*3}	0.22 ^{*3}	62 ^{*3}
<i>S. elongatus</i> PCC 7942 (Cyanobacterium)	230 ^{*4}	0.27 ^{*4}	90 ^{*4}
<i>R. sphaeroides</i> (Bacterium)	338 ^{*5}	0.10 ^{*5}	550 ($S_{1/2\text{ATP}}$) ^{*5, 6}

全てのデータは 25°C で測定された。

*1: Specific activity

*2: Reference Data from 遠藤, 2013

*3: Reference Data from Porter et al., 1986

*4: Reference Data from Kobayashi et al., 2003

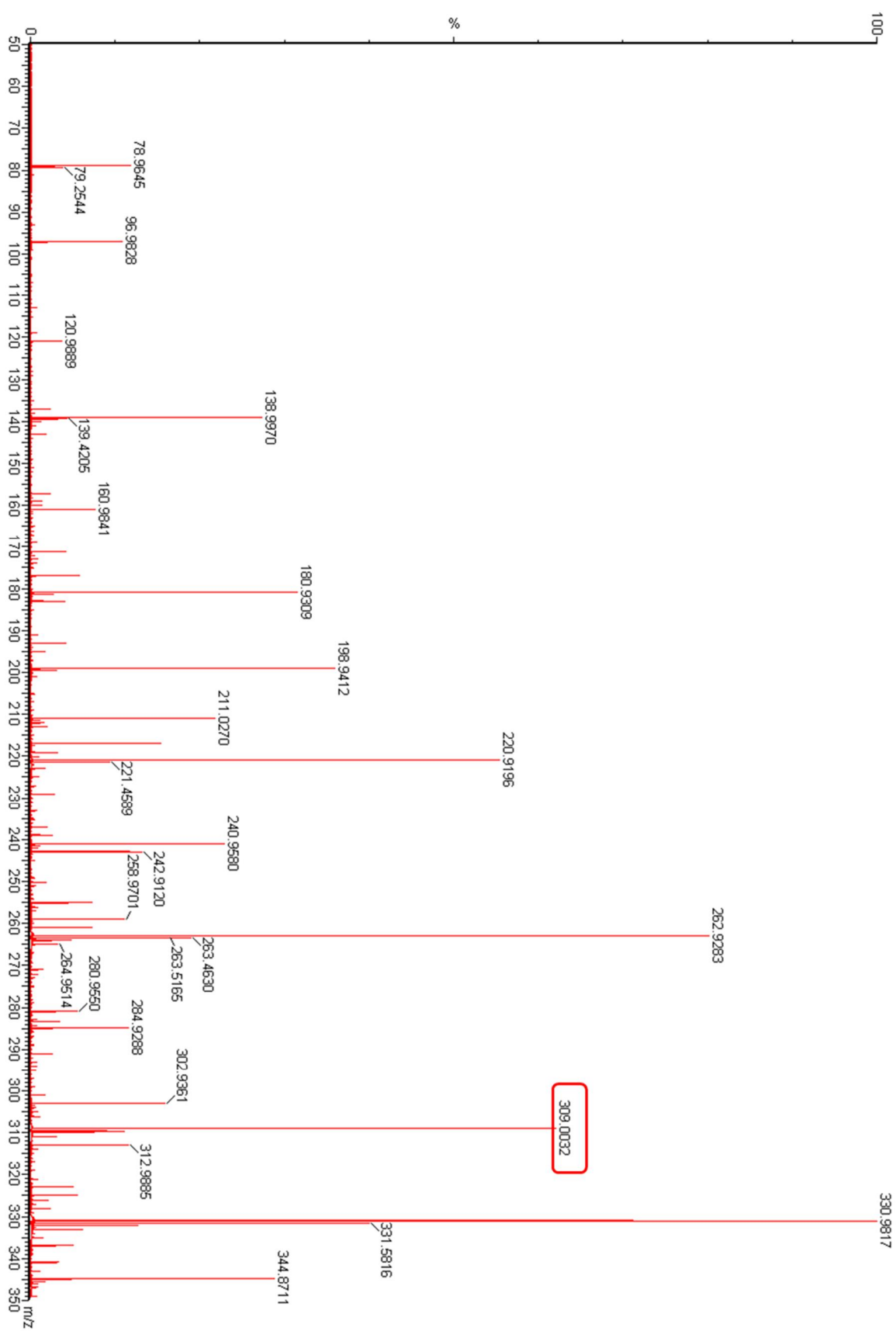
*5: Reference Data from Runquist and Mizioroko, 2006

*6: *R. sphaeroides* PRK は ATP の [S] δv plot がミカエリスメンテンの式でフィットしないシグモイド曲線を示すため、ATP に対する K_m 値は、Hill equation により算出した $S_{1/2\text{ATP}}$ となる。

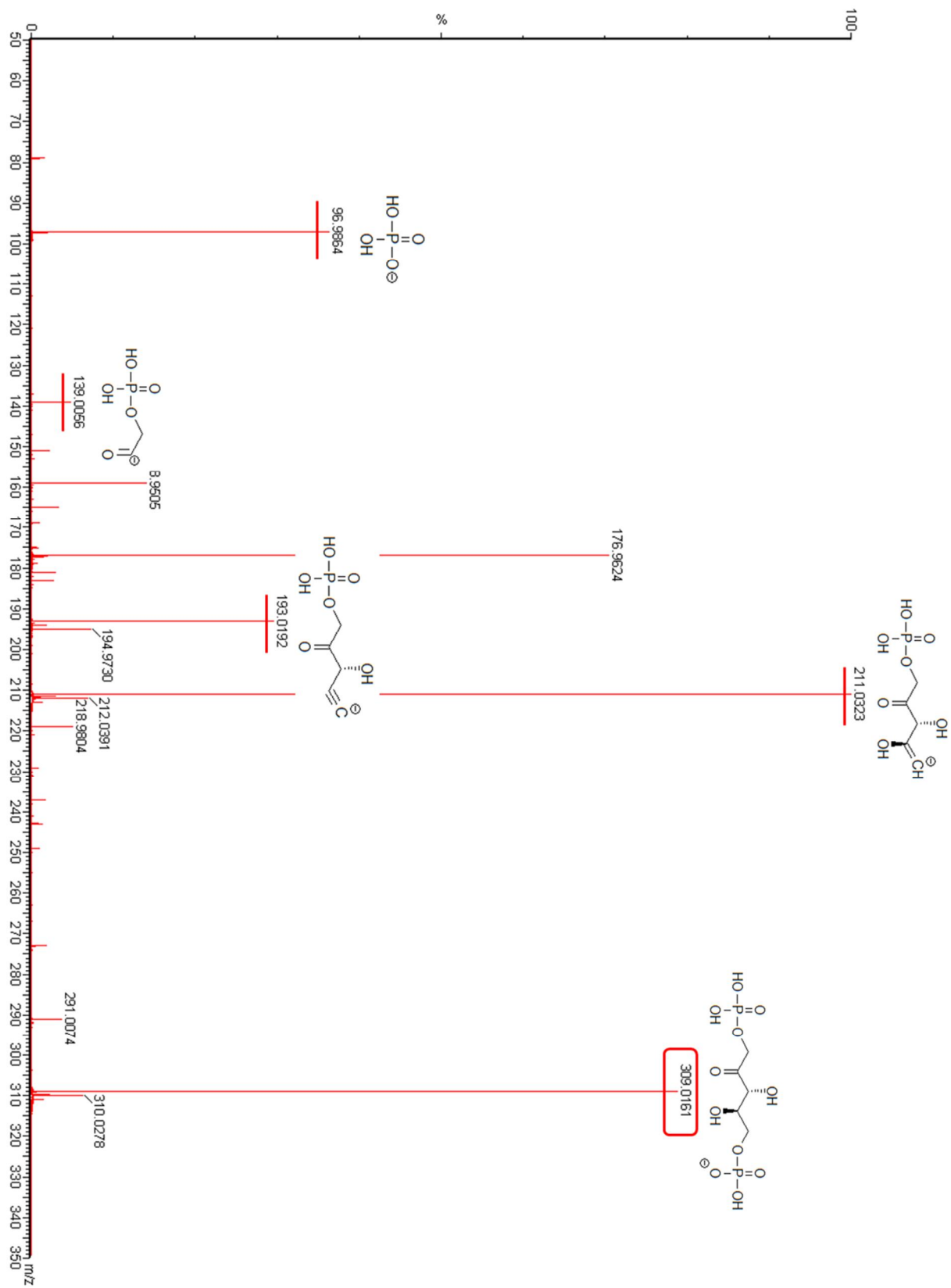
アーキア型 PRK の酵素学的パラメータの値は、全て独立した 3 回の実験の平均値 \pm SD を示す。

N.T.: Not tested

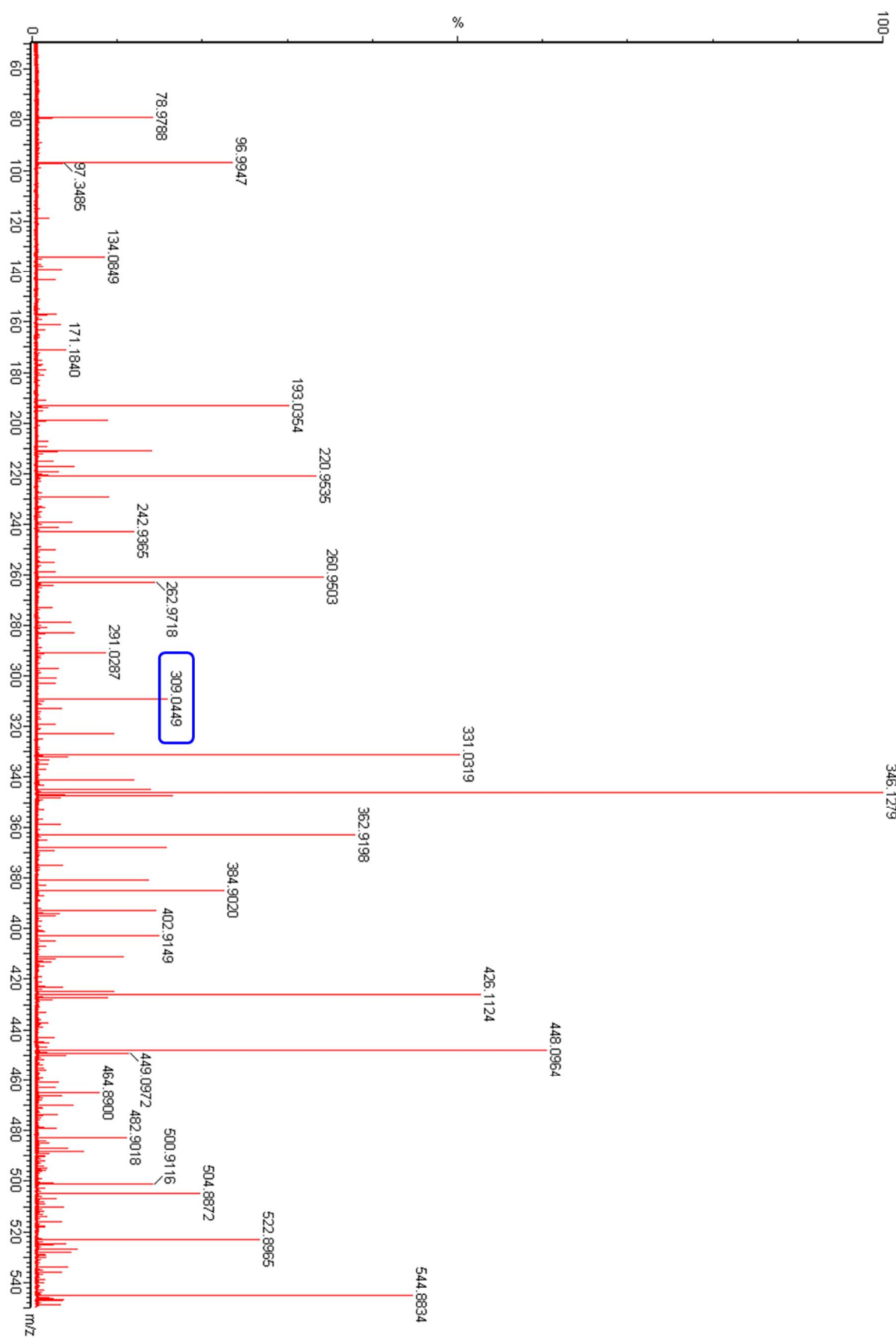
(a)

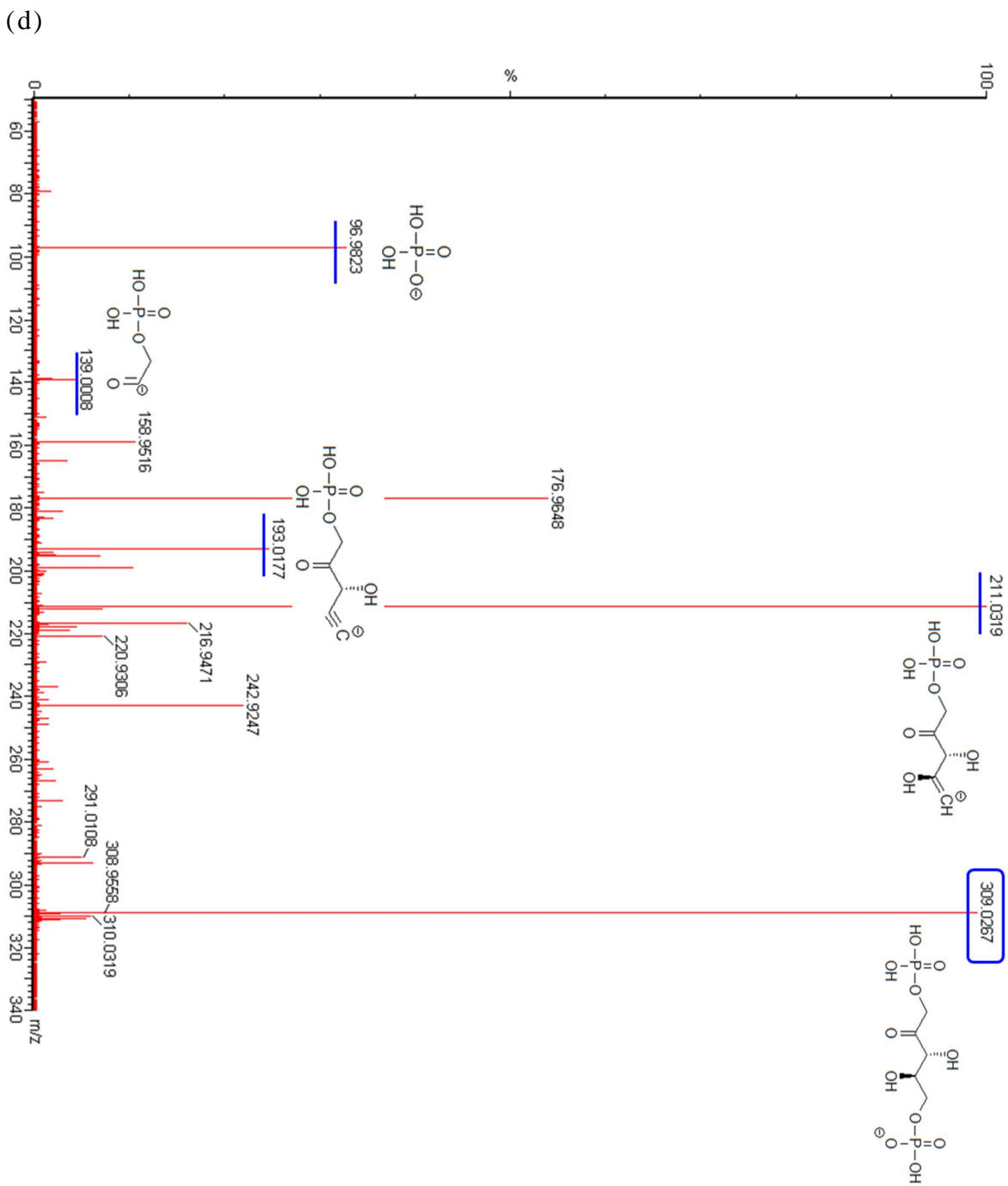


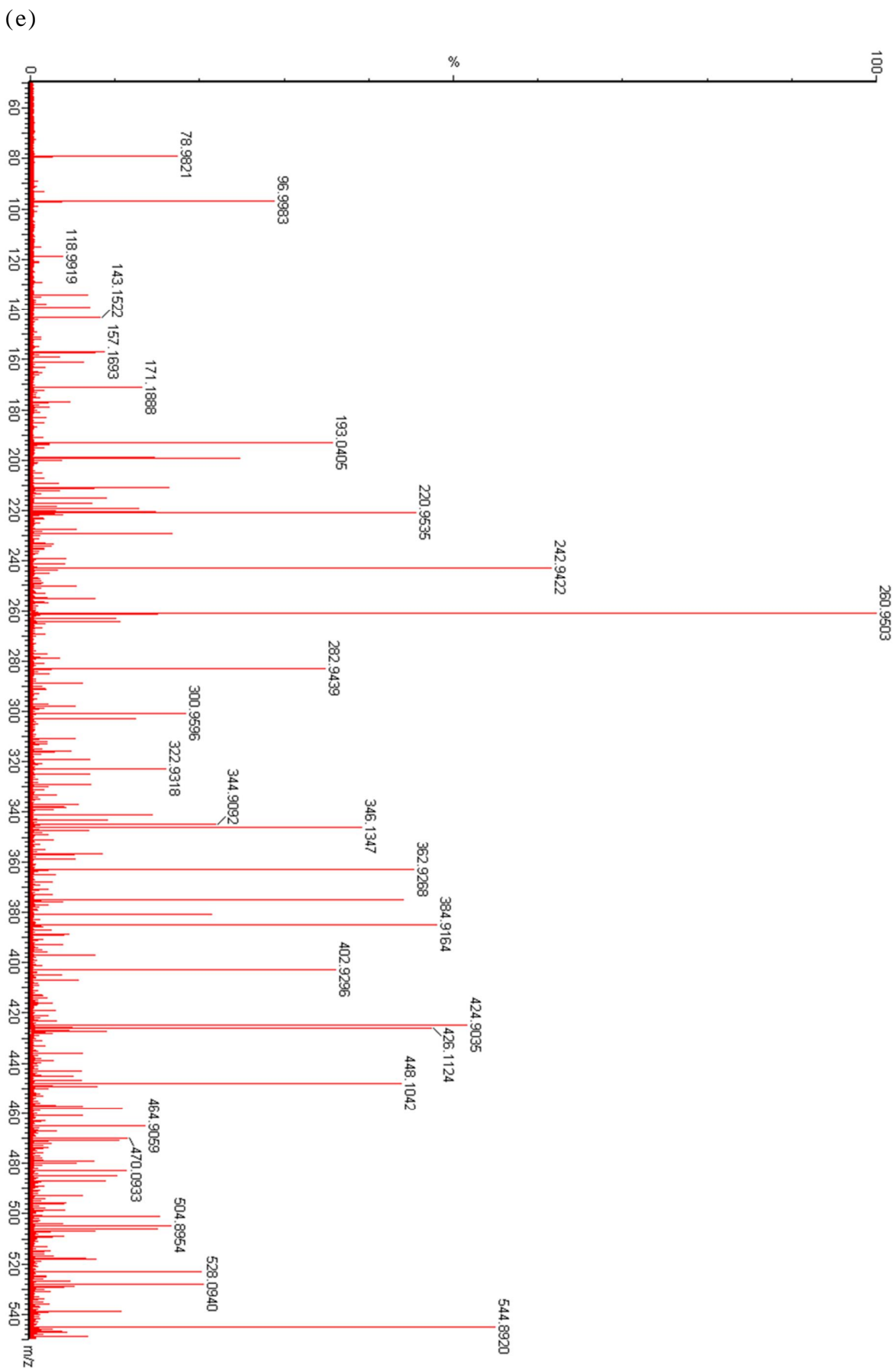
(b)



(c)







(f)

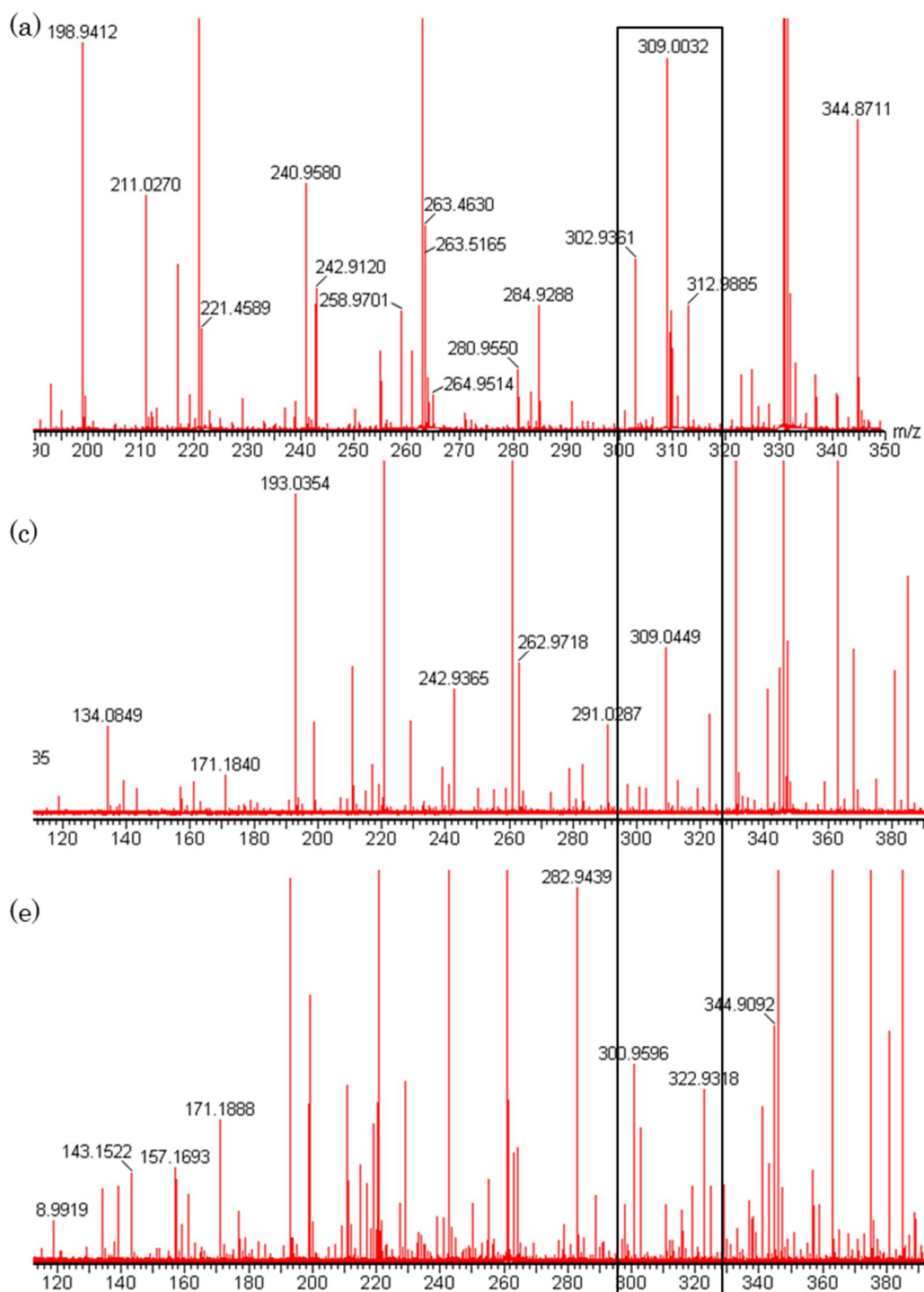


Fig. 2-5 *M. hungatei* PRK ホモログの反応生成物の解析

M. hungatei PRK ホモログの Ru5P と ATP からの反応生成物の質量分析を行った。

(a) コントロール RuBP (309 m/z)、(b) (a)で得られた 309 m/z のピークの MS/MS 解析を行ったもの。図内にそれぞれのピークに該当する化合

物化学式を示す。(c) *M. hungatei* PRK ホモログの反応生成物の MS 解析結果。(d) (c)で得られた 309 m/z のピークの MS/MS 解析を行った結果。(e) *M. hungatei* PRK ホモログを反応系から除いたネガティブコントロールの MS 解析結果。(f) (a), (c), (e)の RuBP 付近を拡大した。コントロール、反応生成物でのみ 309 m/z のピーク(黒枠)が検出されている。

Table 2-2 *M. hungatei* PRK の基質特異性

Enzyme	Substrate	Activity
Phosphoribulokinase	2 mM Ru5P	29 μ mol/min/mg
Pantothenate kinase	6 mM pantothenate	N.D.
Thymidine kinase	2 mM thymidine	N.D.
Uridine kinase	2 mM uridine	N.D.
Cytidine kinase	2 mM cytidine	N.D.
Ribosylnicotinamide kinase	2 mM ribosylnicotinamide	N.D.
Adenylate kinase	2 mM AMP	N.D.
6-phosphofructo-2-kinase	2 mM F6P	N.D.
Ribose 5-phosphate kinase	2 mM R5P	N.D.

N.D.: Not detected

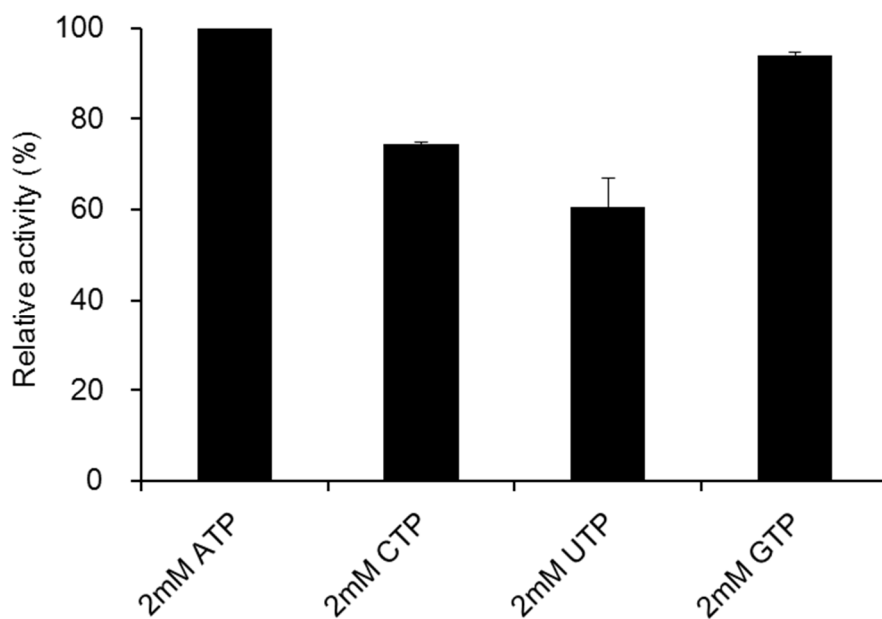


Fig. 2-6 *M. hungatei* PRK の Nucleoside triphosphate (NTP)特異性

M. hungatei PRK のリン酸基供与体の特異性に関しては、精製した *M. hungatei* PRK を用いて測定を行った。通常は ATP をリン酸基供与体として用いるが、ATP をほかの NTP (CTP, UTP, GTP) に置き換えた。影響の評価は、ATP 利用時の活性値を 100% としてそれぞれの NTP を利用した際の活性値を算出した。これらの値は独立した 3 回の実験の平均値 \pm SD を示す。

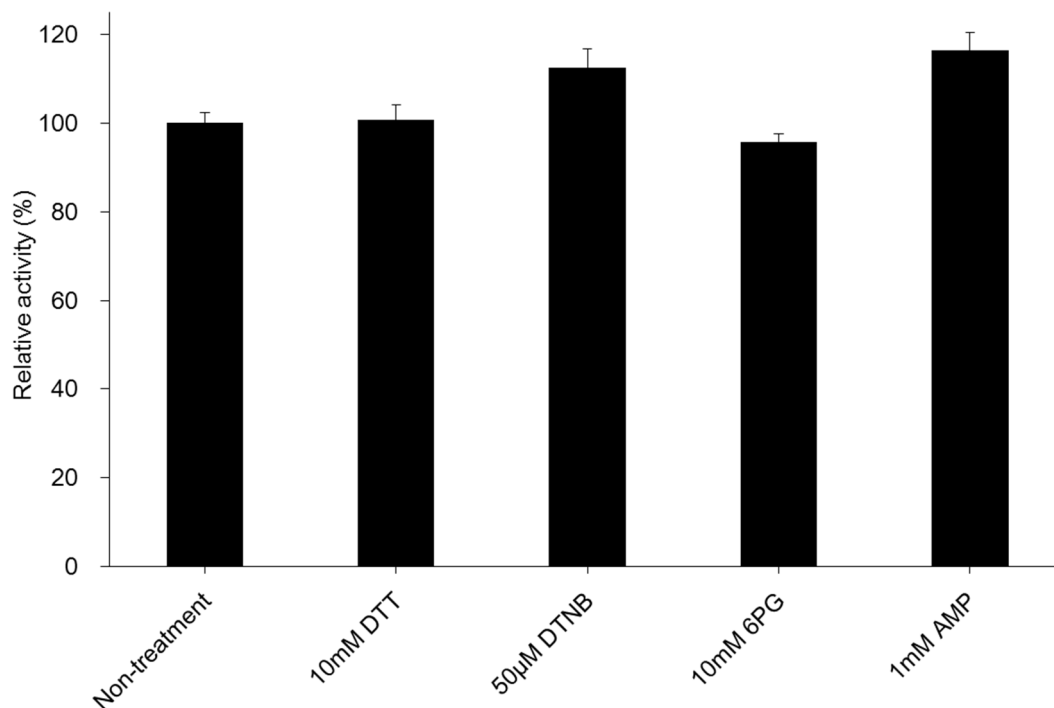


Fig. 2-7 アーキア型 PRK 活性に対する光合成 PRK の inhibitor/activator の影響

酸化還元に関する inhibitor/activator に関しては、精製した *M. hungatei* PRK を還元剤 DTT (終濃度 10 mM) 及び、酸化剤 DTNB (終濃度 50 µM) とあらかじめ 30 分間インキュベートしたものをを用いて、測定を行った。6-phosphocluconate (6PG) と AMP は、それぞれ 10 mM、1 mM の終濃度で測定キュベット内に添加し、測定を行った。影響の評価は、未処理時の活性値を 100% としてそれぞれの物質での処理時の活性値を算出した。これらの値は独立した 3 回の実験の平均値 ±SD を示す。

Table 2-3 データ収集と精密化の統計情報

Data set	MhPRK	MhPRK (SeMet)
X-ray Source	SPring-8	SPring-8
Space group	$P2_12_12_1$	$P3_121$
Unit-cell		
<i>a</i> (Å)	78.41	99.49
<i>b</i> (Å)	93.82	99.49
<i>c</i> (Å)	99.94	171.8
Wavelength (Å)	0.90	0.975
Resolution Range	50.0-2.4	50.0-2.6
	(2.54-2.50) ¹	(2.64-2.60) ¹
Total reflections	69677	265992
Unique reflections	24121	51800
Completeness (%)	92.2 (90.0)	88.7 (61.2)
R-merge (%) ²	7.3 (27.4)	8.6 (37.0)
I/	13.5 (2.0)	17.2 (1.6)
Phasing		
No. of sites		18
FOM ³		0.24
Refinement		
Resolution	50.0-2.5	
Rwork / Rfree (%)	0.222/0.280	
No. atoms		
Protein	4944	
Ligand(Dioxia	20	
Water	154	
R.m.s. deviation ⁴		
Bond length	0.009	
Bond angles	1.47	

¹Values in parentheses are for the highest resolution shells.

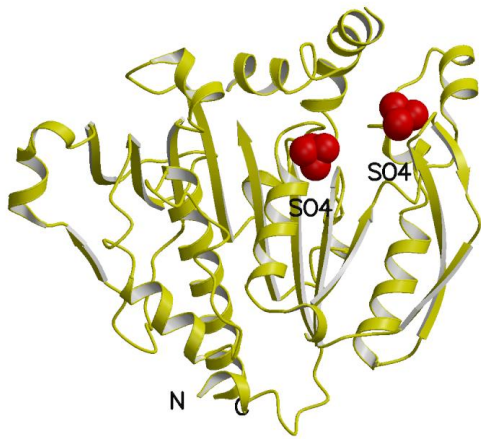
² $R\text{-merge}(I) = \frac{|I(k) - \langle I \rangle|}{I(k)}$, where $I(k)$ is the value of the k th measurement of the intensity of a reflection, $\langle I \rangle$ is the mean value of the intensity of that reflection and the summation is over all measurement.

³FOM σ figure of merit = $\frac{|F(hkl)_{\text{best}}|}{|F(hkl)|}$; $F(hkl)_{\text{best}} = \frac{P(\sigma)}{P(\sigma)} F_{hkl}(\sigma)$

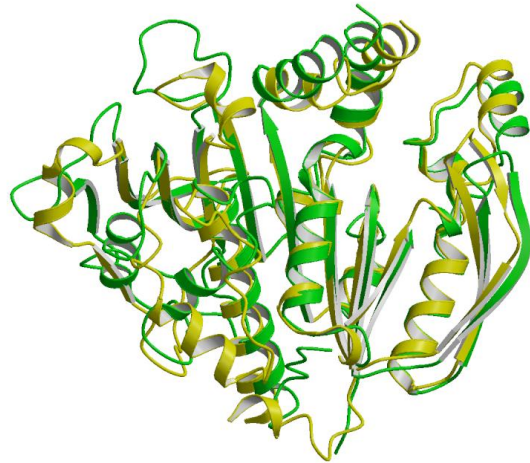
⁴R.m.s.deviation σ root-mean-square deviation

(Data from Kono et al., 2017)

(a)



(b)



(c)

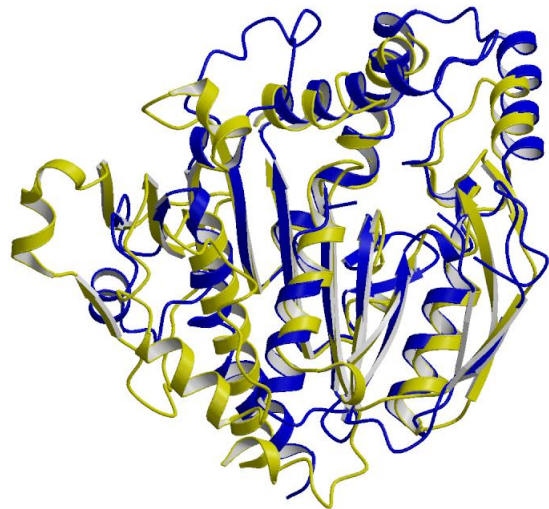
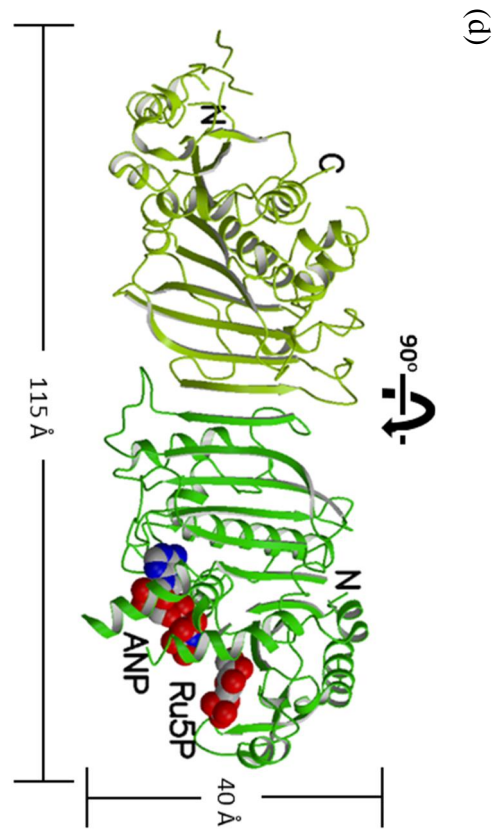
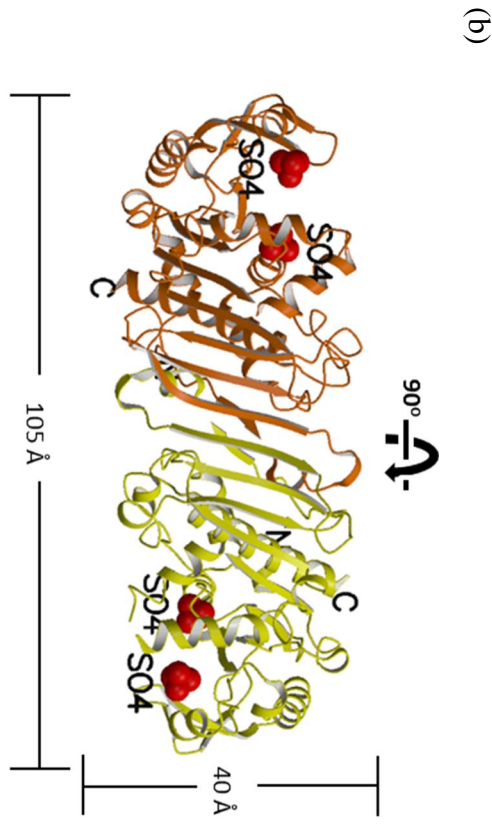
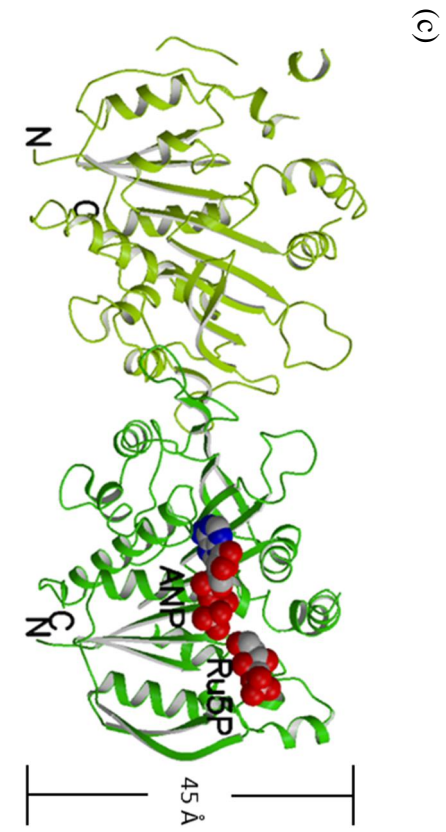
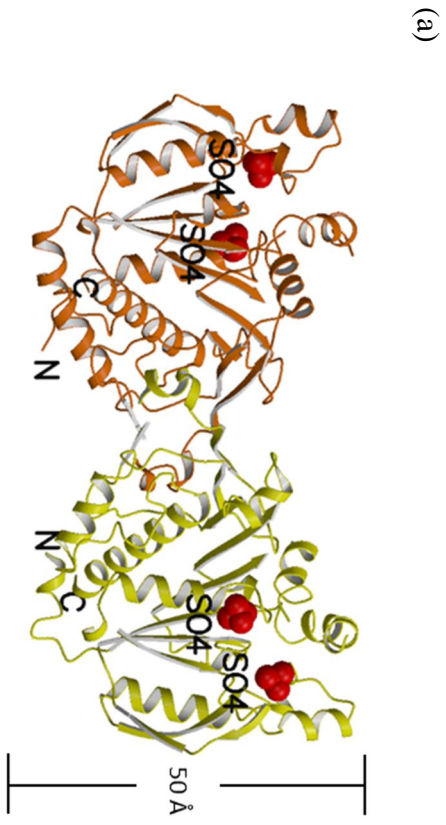
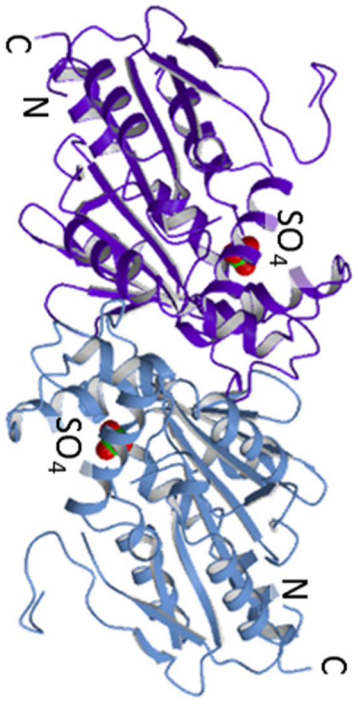


Fig. 2-8 *M. hungatei* PRK と光合成 PRK との単量体構造比較

(a) *M. hungatei* PRK の単量体。(b) *M. hungatei* PRK (黄)と *S. elongates* PCC7942 PRK (植物型、緑)との重ね合わせ。(c) *M. hungatei* PRK (黄)と *R. sphaeroides* PRK (バクテリア型、青)との重ね合わせ。

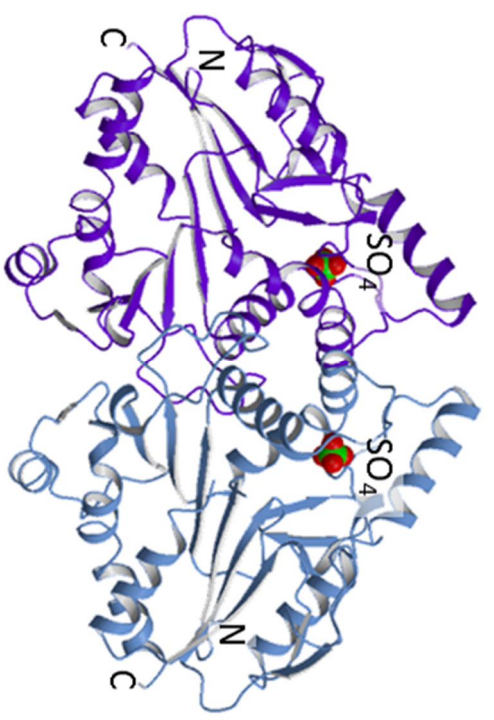


(e)



(f)

90° ↘



(g)

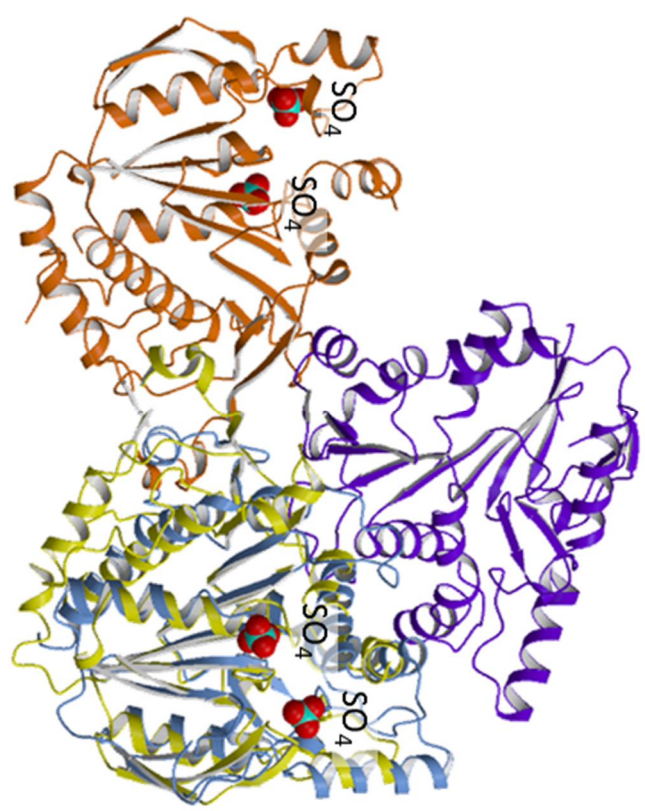


Fig. 2-9 *M. hungatei* PRK と光合成 PRK との二量体形成様式の比較

(a) *M. hungatei* PRK の二量体形成様式。黄と橙がそれぞれ単量体を示す。(b) (a)を 90°回転させたもの。(c) 植物型 PRK の二量体形成様式。黄緑と緑がそれぞれ単量体を示す。(d) (c)を 90°回転させたもの。(e) バクテリア型 PRK の二量体形成様式。青と紫がそれぞれ単量体を示す。(f) (e)を 90°回転させたもの。(g) *M. hungatei* PRK とバクテリア型 PRK の二量体形成様式の比較。青と紫がそれぞれバクテリア型 PRK の単量体を示す。

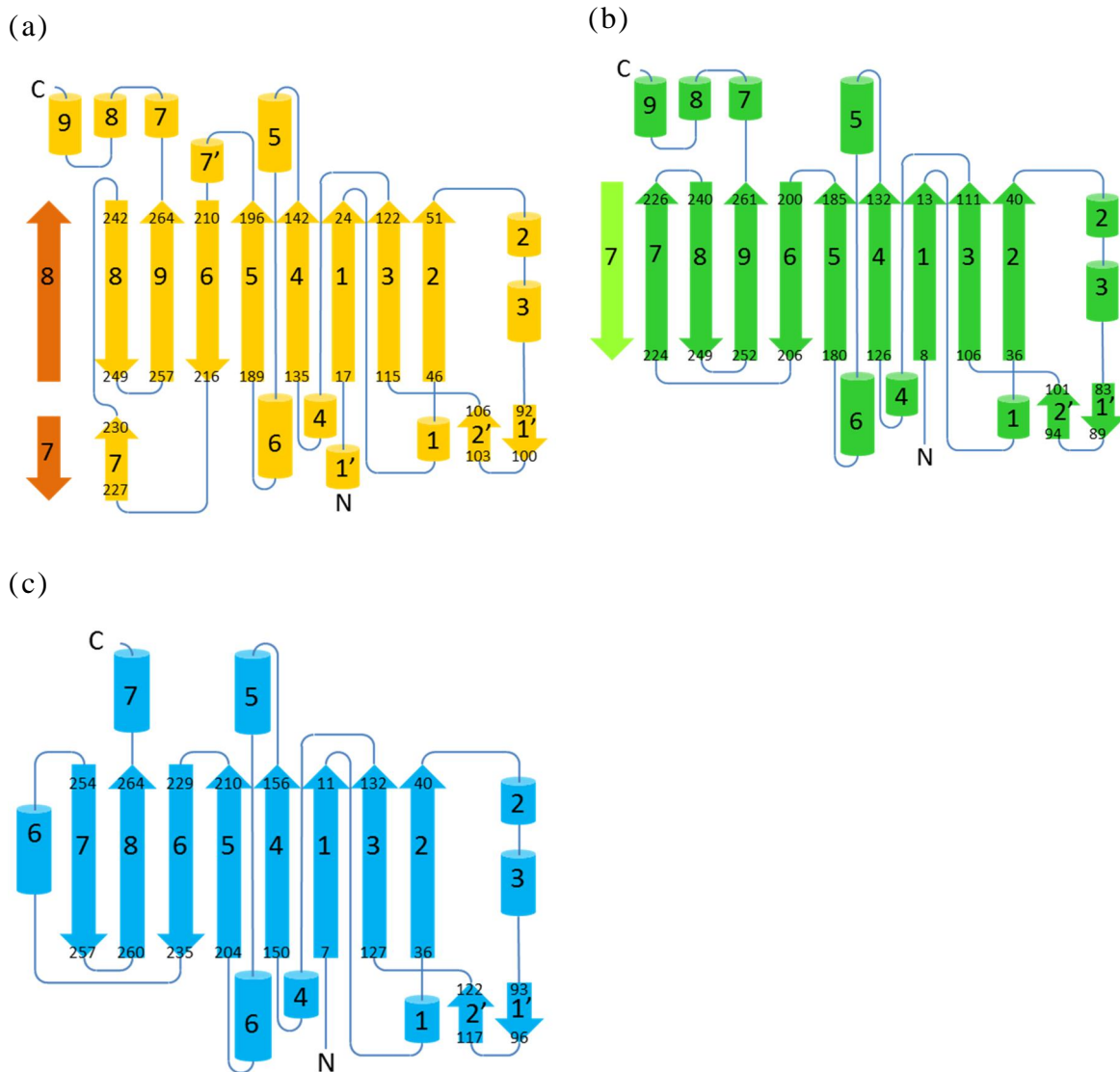


Fig. 2-10 *M. hungatei* PRK と光合成 PRK との二次構造の比較

(a) *M. hungatei* PRK の二次構造。オレンジは、二量体形成時のもう一方の分子を示す。(b) 植物型 PRK の二次構造。黄緑は、二量体形成時のもう一方の分子を示す。(c) バクテリア型 PRK の二次構造。二次構造は α ヘリックスを円柱、 β シートを矢印でそれぞれ示している。

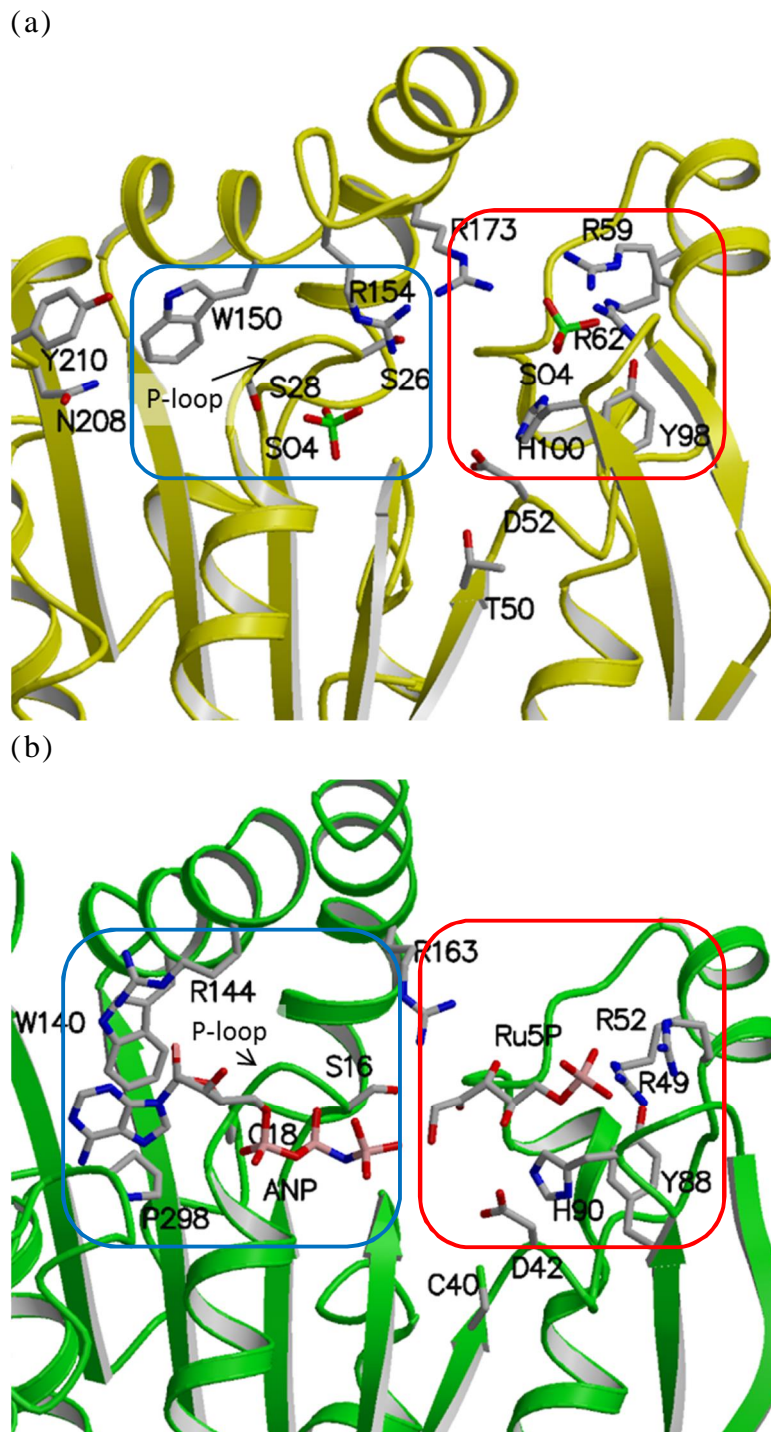


Fig. 2-11 *M. hungatei* PRK と植物型 PRK の活性中心の比較

(a) *M. hungatei* PRK の活性中心と、(b) 植物型 PRK の活性中心。
赤枠は Ru5P との結合に、青枠は ATP との結合に関与する部位をそれぞれ示す。

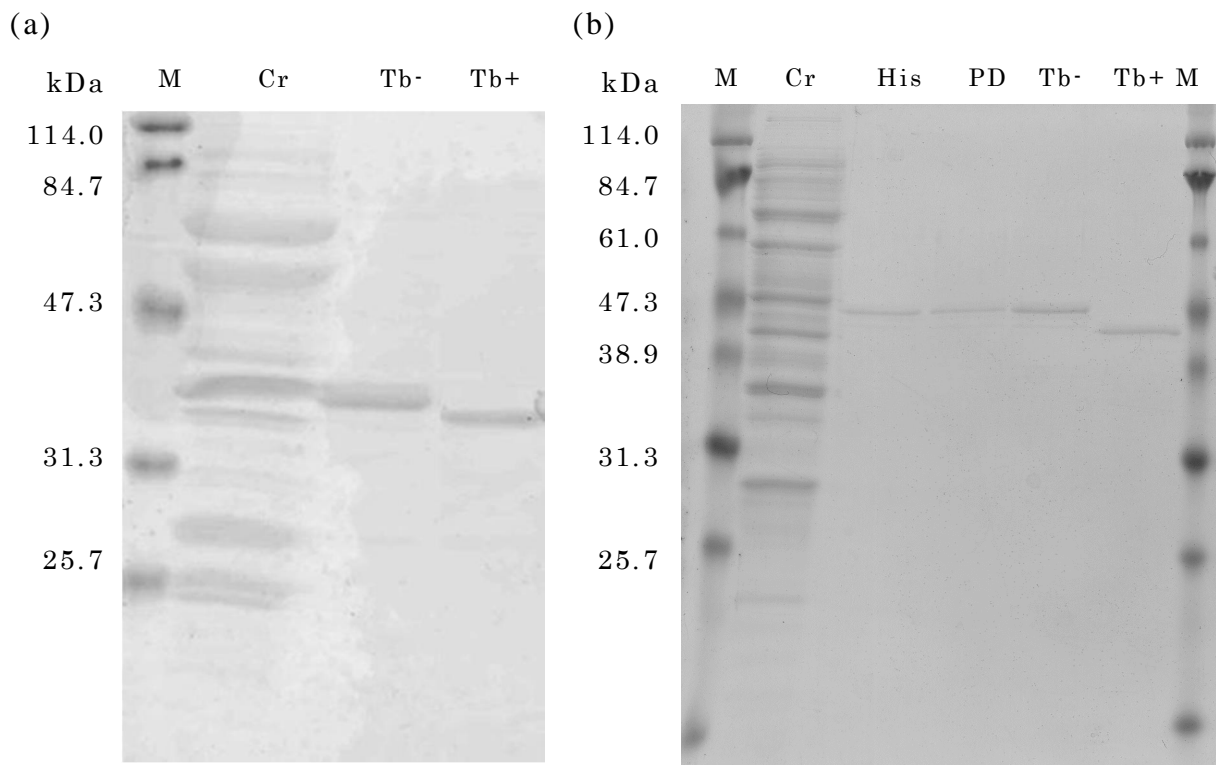


Fig. 2-12 *M. hungatei* RuBisCO ホモログの精製

M. hungatei RuBisCO ホモログの精製を SDS-PAGE で確認した。各レーンはそれぞれ、M: マーカー、Cr: 粗酵素タンパク質 (5 $\mu\text{g}/\text{lane}$)、His: His-tag 精製物 (1 $\mu\text{g}/\text{lane}$)、PD: PD-10 溶出物 (1 $\mu\text{g}/\text{lane}$)、Tb-: Thrombine 未処理 (1 $\mu\text{g}/\text{lane}$)、Tb+: Thrombine 処理後 (1 $\mu\text{g}/\text{lane}$)、Gel: ゲルろ過クロマトグラフィー後 (1 $\mu\text{g}/\text{lane}$)を示す。(a) pET15b 発現系、(b) pUC18 発現系。なお、*M. hungatei* RuBisCO ホモログの分子質量は、43 kDa である。

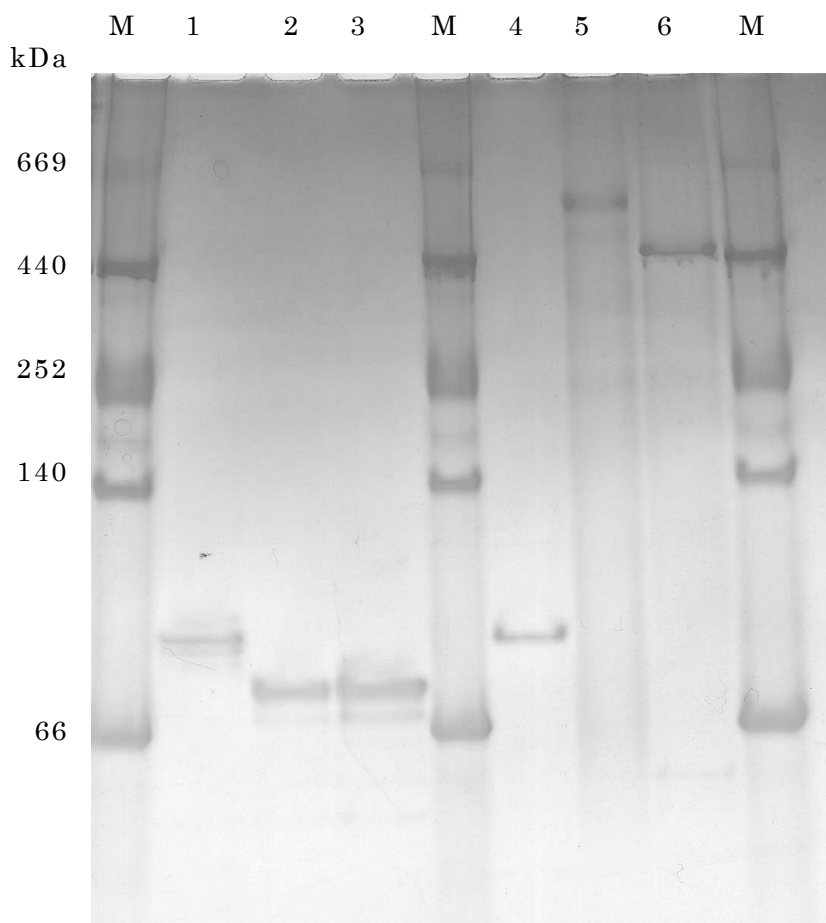


Fig. 2-13 *M. hungatei* RuBisCO の Native-PAGE

M. hungatei RuBisCO のホロ酵素分子量を概算するために Native-PAGE を行った。マーカー(M)には市販の Native-PAGE 用マーカー及び、当研究室で得られた他生物の RuBisCO (Lane 4~6)を用いた。

1: Thrombin 未処理 (3 μ g), 2: Thrombin 処理後 (3 μ g), 3: Thrombin 処理後 (5 μ g), 4: *R. rubrum* RuBisCO (3 μ g, 112 kDa), 5: *M. concilii* RuBisCO (5 μ g, 530~636 kDa), 6: *T. elongatus* RuBisCO (5 μ g, 560 kDa)。

Table 2-4 *M. hungatei* RuBisCO と他生物 RuBisCO の carboxylase 活性の比較

Species	V_{cmax} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)
<i>M. hungatei</i> (Archaeon)	0.169 ± 0.004 * ¹
<i>M. hungatei</i> (0.6 mM CABP treated)	N.D.
<i>M. concilii</i> (Archaeon)	0.35 * ²
<i>M. jannaschii</i> (Archaeon)	6.5 (85°C) * ^{1, 3}
<i>M. acetivorans</i> (Archaeon)	0.4 (85°C) * ^{1, 3}
<i>T. kodakarensis</i> (Archaeon)	19.8 (90°C) * ^{1, 4}
<i>S. oleracea</i> (Plant)	2.76 * ⁵
<i>T. elongatus</i> (Cyanobacterium)	1.83 * ⁶
<i>R. rubrum</i> (Bacterium)	6 * ⁷

記載がないデータは全て 25°C で測定された。

*¹: Specific activity

*²: Reference Data from 川上, 2016

*³: Reference Data from Finn and Tabita, 2003

*⁴: Reference Data from Ezaki et al., 1999

*⁵: Reference Data from Salvucci et al., 1986

*⁶: Reference Data from Gubernator et al., 2008

*⁷: Reference Data from Schloss et al., 1982

M. hungatei RuBisCO の酵素学的パラメータの値は独立した 3 回の実験の平均値 \pm SD を示す。

N.D.: Not detected

Table 2-5 *M. hungatei* RuBisCO と他生物 RuBisCO の S_{rel} 値の比較

Species	$S_{rel} (S_{c/o})$
<i>M. hungatei</i> (Archaeon)	1.94 ± 0.31
<i>M. burtonii</i> (Archaeon)	1.08 * ¹
<i>T. kodakarensis</i> (Archaeon)	11 * ²
<i>A. fulgidus</i> (Archaeon)	4 (83°C) * ³
<i>R. rubrum</i> (Bacterium)	9 * ⁴
<i>S. elongatus</i> PCC7942 (Cyanobacterium)	45 * ⁵
<i>C. reinhardtii</i> (Green algae)	71 * ⁵
<i>S. oleracea</i> (Plant)	94 * ⁵

記載がないデータは全て 25°C で測定された。

*: Reference Data

¹: Data from Alonso et al., 2009, ²: Data from Nishitani et al., 2010,

³: Data from Kreel and Tabita, 2007, ⁴: Data from Mueller-Cajar et al., 2007,

⁵: Data from Uemura et al., 1996

M. hungatei RuBiCO の S_{rel} 値は独立した 3 回の実験の平均値 ±SD を示す。

2-4. 考察

2-4-1. アーキアにおけるカルビンサイクル鍵酵素

本章での実験結果から、メタン菌 *M. hungatei* を始めとした計 5 種のアーキアが有する PRK ホモログが、光合成 PRK と同様の反応を触媒する PRK であることが示された。また、光合成生物に特異的だと考えられていた PRK が、非光合成生物であり、生命の起源に近いと考えられているアーキアにも広く存在していることを明らかにした。アーキアにおいて機能的な PRK の存在を証明したのは、本研究が世界で初めてである。また、これらアーキア型 PRK の酵素学的解析を行ったところ、アーキア型 PRK の酵素学的特徴として、 V_{max} は光合成生物 PRK と比較して低いが、基質 Ru5P に対する親和性は同程度、特に ATP に対する親和性が高い傾向が示された (Table 2-1)。

独立栄養性のメタン菌はエネルギー生産能力が非常に低いため、生体内に存在する ATP 濃度が非常に低く、ATP を基質とする酵素にとって奪い合いが起こる。そのため、これを解決するために、ATP に対する親和性が高くなるように PRK が進化したのではないかと考えられる。これまで報告されているアーキアが有する他の kinase の $K_{m(ATP)}$ は 0.092~0.5 mM (Huang et al., 1999; Daugherty et al., 2001; Valentin-Hansen, 1978; Sakuraba, 2003; Sakuraba et al., 2005; Tomita et al., 2012; Sato et al., 2013) と、本章で明らかにしたアーキア型 PRK と比較すると、ATP への親和性が低い。当然、これらの kinase が全てではないが、生体内においてアーキア型 PRK は他の kinase より優先的に ATP を利用できることが予想される。さらに、ATP 以外の NTP も基質として利用することができ、特に GTP は ATP と同様に基質として利用できることが分かった (Fig. 2-6)。これは光合成生物の PRK には見られない特徴であり (Hurwitz et al., 1956; Siebert et al., 1981)、前述の ATP への親和性と同様に、エネルギー資源の乏しいアーキア生体内において、より効率的な酵素活性を発揮するためへの機能進化であると考えられる。

加えて、*M. hungatei* は PRK と共に、RuBisCO を有していることも、本章の実験で明らかにした。興味深いことに、RuBisCO の系統樹において、*M. hungatei* RuBisCO を含む一部のメタン菌由来の RuBisCO は、これまでの form III とは異なるクレードを作っている (Fig. 2-14)。区別するために、*M. hungatei* RuBisCO を含むクレードを form III-a、その

他アーキア RuBisCO のクレードを form III-b とした。Form III-a に属するメタン菌は全て RuBisCO と PRK の両遺伝子を有するという共通点が見られる。*M. hungatei* RuBisCO の酵素学的解析を行ったところ、0.146 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ の carboxylase 活性を示した (Table 2-4)。この値は、これまでに報告されている form III RuBisCO や、酸素発生型光合成生物の有する RuBisCO と比較して低いが、RuBisCO の阻害剤 CABP 存在下では活性が検出できなかったことから、明らかに RuBP を基質とした carboxylase 反応を触媒することを示した。また、*M. hungatei* RuBisCO の S_{rel} 値は非常に低く、これまでに明らかにされていた form III 及び嫌気性生物由来の RuBisCO と共通していた (Table 2-5)。大気中の O_2 濃度が非常に低い原始地球から現在の 21% にまで上昇してきた過程で、RuBisCO もまた、より効率的に carboxylase 反応を行えるよう分子進化し、それが S_{rel} 値の増加という形で反映されている (Tcherkez et al., 2006)。そのため、*M. hungatei* を含むアーキア RuBisCO の S_{rel} 値が非常に低いことは、アーキアは生物としてだけでなく、有している RuBisCO 自体も、RuBisCO として非常に原始的であることを示しているのではないかと考えられる。

2-4-2. アーキアにおけるカルビンサイクル酵素の分布

本研究が始まった当初、いくつかのアーキアのゲノム解読は終了していたものの、*M. hungatei* のように PRK 遺伝子をコードしているものについての報告は皆無であった。近年のシーケンス技術の進展も伴い、ゲノム解読が終了したアーキアは、現在 200 種にも上る。その中でも、RuBisCO 遺伝子をコードしていると予想されるアーキアは 60 種以上、さらに同時に PRK 遺伝子もコードしているアーキアは、15 種が確認できている (Fig. 2-15)。一方で、PRK 遺伝子のみを有しているアーキアは存在しない。本章ではそのうち *M. hungatei* の RuBisCO と PRK、*M. hungatei* 以外の 4 種のアーキアが有する PRK の酵素学的解析を行った。

PRK はそのアミノ酸配列より、バクテリア型と、植物型に分類され、どちらも PRK として同じ機能を持つにも関わらず、これらの相同性は 30% 程度と低い (Miziorko, 2000)。本章で明らかにした *M. hungatei* PRK を始めとするアーキア型 PRK はこれらと独立したクレードを形成し、第 3 の PRK グループと言える (Fig. 2-15)。アーキア型 PRK もバクテリ

ア型、植物型 PRK とそれぞれ 30% 程度の相同性を示すが、系統樹ではバクテリア型より植物型に進化距離 (evolutionary distance) が近い。また X 線結晶構造解析によって、単量体構造の RMSD、二量体形成様式の類似性から、アーキア型 PRK は植物型 PRK と類似性が高いことが示唆された (Fig. 2-8~10)。これらのことから、アーキア型 PRK で光合成型 PRK の骨格 (二次構造) がほぼ形成され、その後、活性部位や、レドックスレギュレーションの Cys 残基などのマイナーなアミノ酸置換と構造変化で、植物型 PRK に進化したのではないだろうか。つまり、アーキア型 PRK が植物型 PRK の進化的起源であるという、PRK 分子進化仮説を考えた。

また、*M. hungatei* PRK はゲルろ過クロマトグラフィーの結果 (Fig. 2-3)、結晶構造解析の結果 (Fig. 2-9) から、ダイマー構造であることが示されたが、*M. concilii* 及び *M. thermophila* PRK はゲルろ過クロマトグラフィーの結果からテトラマー構造であることが示唆されている (Fig. 2-3)。系統解析からアーキア型 PRK は大きく 2 つのグループに分かれることが予想されるが (Fig. 2-15)、今回の結果はそれぞれのグループでホロ酵素の構成が異なることを示唆するものである。立体構造を明らかにしないと完全にテトラマー構造だとは言いきれないが、構造的な PRK の分子進化を考えるためにも、興味深い問題である。加えて、メタン菌でない *A. profundus* の PRK は PRK 活性が非常に低く、*M. hungatei* PRK では検出できなかった他基質への kinase 活性を有するのではないかと考えている。こちらも非メタン菌アーキア型 PRK グループとして、引き続き解析を行う予定である。

2-4-3. アーキアにおけるカルビンサイクル様代謝経路

本章での結果より、このアーキアにおいて RuBisCO と PRK が機能する CO₂ 固定経路が機能していることが予想された。光合成生物におけるカルビンサイクルを構成する 11 酵素の内、RuBisCO と PRK を除く 9 酵素は解糖系、糖新生、酸化型ペントースリン酸経路の酵素と共通している。しかし、酸化型ペントースリン酸経路の遺伝子は、いずれのアーキアにも揃っておらず、解糖系、糖新生ともに、アーキア特有の変形型代謝経路を利用している (Orita et al., 2006; Siebers and Schönheit, 2005; Verhees et al., 2003)。これは *M. hungatei* を含む PRK を

有するアーキアにも当てはまり、そのゲノム情報より、3つのカルビンサイクル酵素 (transketolase、sedoheptulose-1,7-bisphosphatase、ribulose -5-phosphate 3-epimerase) 遺伝子を有しておらず、カルビンサイクル上の fructose-6-phosphate (F6P) から Ru5P への経路が断たれており、完全なカルビンサイクルが機能できない (Fig. 2-16)。これまでアーキアやバクテリアで報告されている代謝経路と PRK を有するアーキアのゲノム情報から、欠けた反応ステップをアーキアやバクテリアに特有な ribulose monophosphate (RuMP, リブローズモノリン酸) 経路の F6P から 3-hexulose-6-phosphate (Hu6P) への反応を触媒する 6-phospho-3-hexuloisomerase (PHI) と Hu6P から Ru5P と formaldehyde への反応を触媒する 3-hexulose-6-phosphate synthase (HPS) を利用していることが予想された。これらの事から *M. hungatei* において、RuBisCO と PRK を利用した、原始カルビンサイクルとも言える、新規炭素代謝経路 δ Reductive hexulose phosphate (RHP) pathway を予想した (Fig. 2-16)。

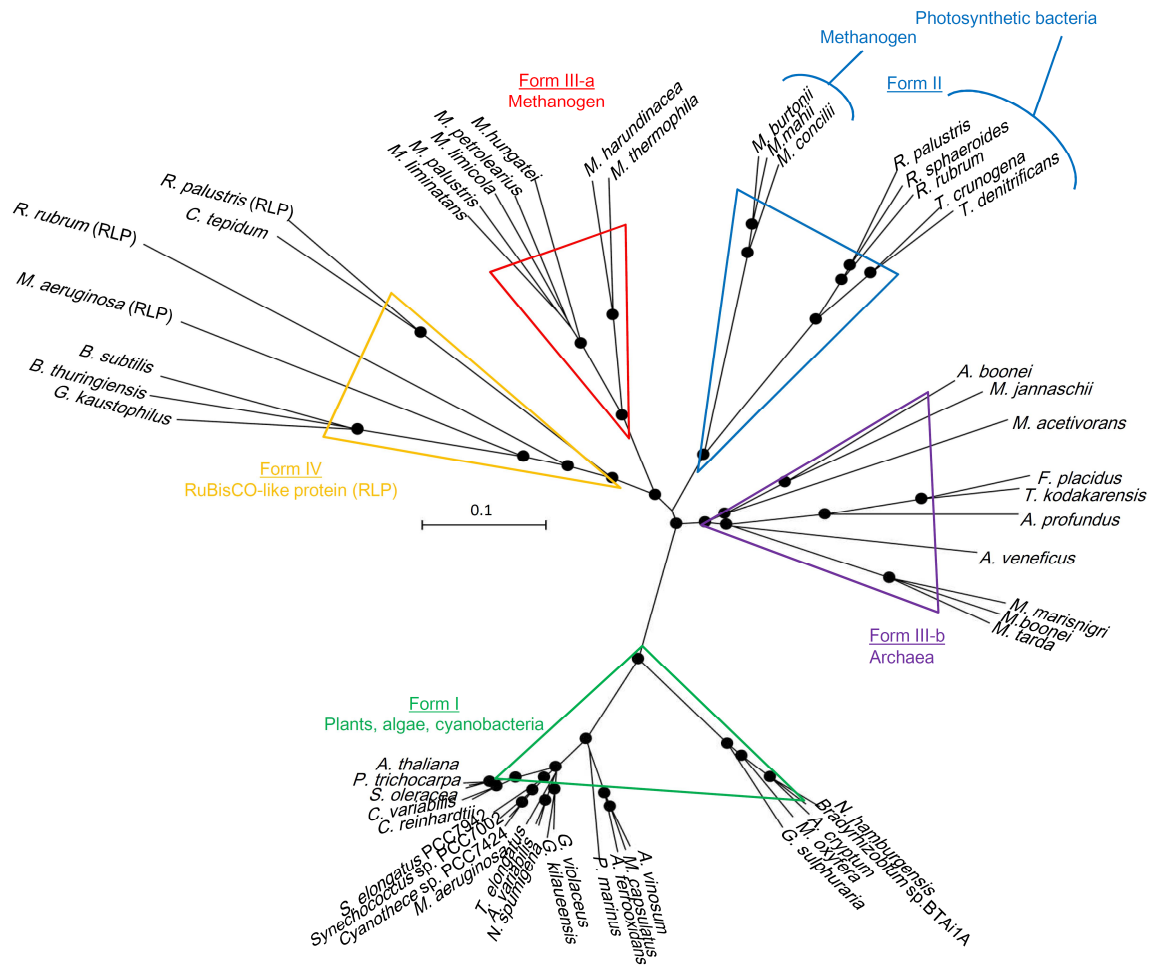


Fig. 2-14 RuBisCO の系統樹

RuBisCO の系統樹は、National Center for Biotechnology Information (NCBI)上の配列データベースから得られた RuBisCO 及び RuBisCO-like protein のアミノ酸配列と、Clustal W を用いて分子系統樹の作成を行った。ブートストラップ値は 1000 回の繰り返しから推測され、75%以上を示すノードを黒丸で示す。RuBisCO は form I (緑)、form II (青)に加え、新たに細分化した form III-a (赤、メタン菌)、form III-b (紫、アーキア)のクレードに分類される。Form IV (黄)の RuBisCO-like protein (RLP)は RuBisCO としての触媒機能は有していない。

C. tepidum, *Chlorobium tepidum*; *B. subtilis*, *Bacillus subtilis*; *G. kaustophilus*, *Geobacillus kaustophilus*; *B. thuringiensis*, *Bacillus thuringiensis*; *M. burtonii*, *Methanococcoides burtonii*; *M. mahii*, *Methanohalophilus mahii*; *M. jannaschii*, *Methanocaldococcus jannaschii*; *M. acetivorans*, *Methanosarcina acetivorans*; *T. kodakarensis*, *Thermococcus kodakarensis*; *R. palustris*, *Rhodopseudomonas palustris* and *N. spumigena*, *Nodularia spumigena*.

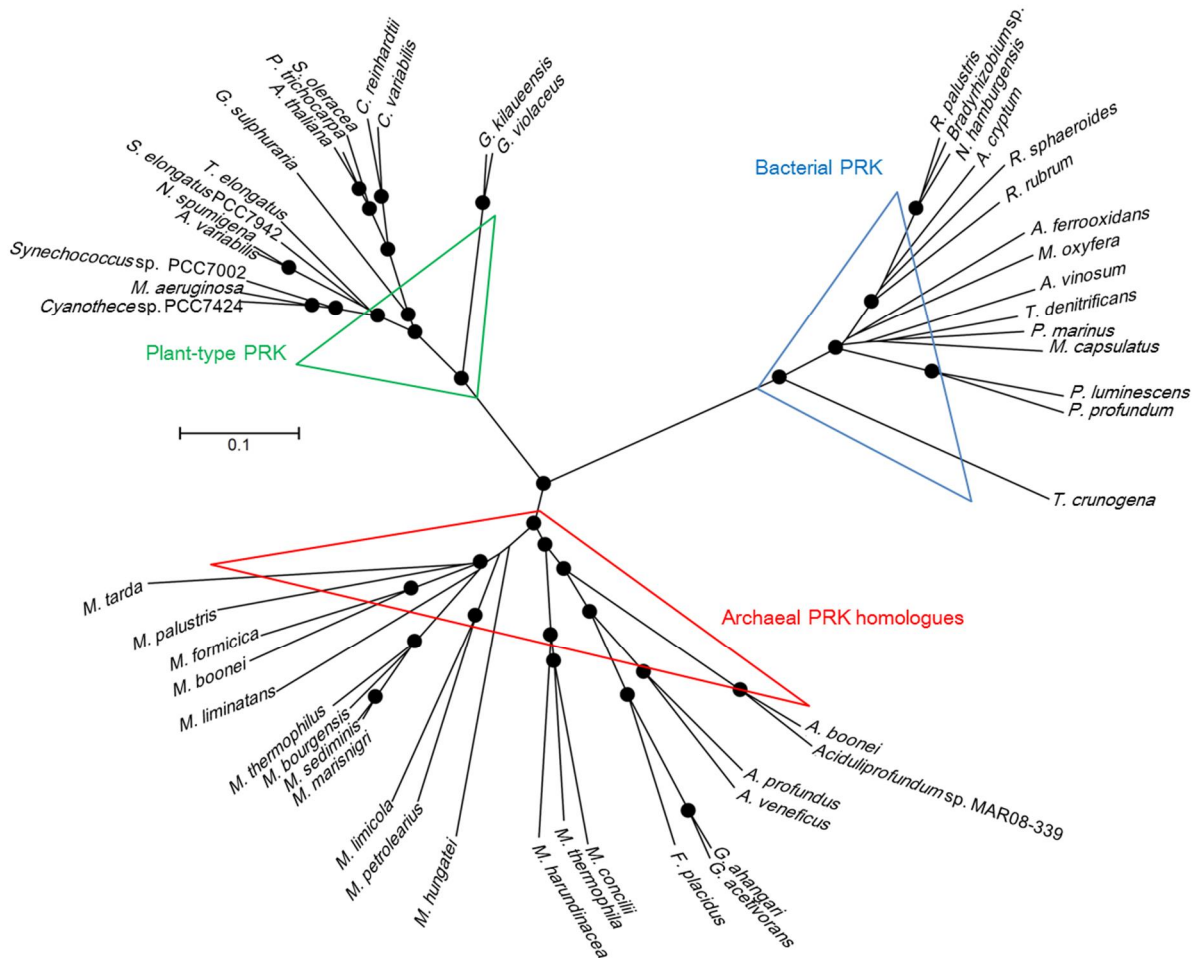


Fig. 2-15 PRK の系統樹

(Modified from Kono et al., 2017)

PRK の系統樹は、NCBI 上の配列データベースから得られた PRK 及び PRK ホモログのアミノ酸配列と、Clustal W を用いて分子系統樹の作成を行った。ブートストラップ値は 1000 回の繰り返しから推測され、75% 以上を示すノードを黒丸で示す。PRK は光合成カルビンサイクルにおいて機能している植物型 (緑)、バクテリア型 (青)に加え、新たにアーキア型 PRK (赤)の存在を明らかにした。

P. luminescens, *Photorhabdus luminescens*; *P. profundum*, *Photobacterium profundum*; *A. ferrooxidans*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*; *M. oxyfera*, *Methylomirabilis oxyfera*; *T. denitrificans*, *Thiobacillus denitrificans*; *A. vinosum*, *Allochromatium vinosum*; *P. marinus*, *Prochlorococcus marinus*; *M. capsulatus*, *Methylococcus capsulatus*; *R. palustris*, *Rhodopseudomonas palustris* BisA53; *N. hamburgensis*, *Nitrobacter hamburgensis*; *A. cryptum*, *Acidiphilium cryptum*; *R. sphaeroides*, *Rhodobacter sphaeroides*; *R. rubrum*,

Rhodospirillum rubrum; *T. crunogena*, *Thiomicrospira crunogena*;
Cyanothece sp. PCC 7424; *M. aeruginosa*, *Microcystis aeruginosa*;
Synechococcus sp. PCC 7002; *A. variabilis*, *Anabaena variabilis*; *N.*
spumigena, *Nodularia spumigena*; *T. elongatus*, *Thermosynechococcus*
elongatus; *S. elongatus* PCC 7942, *Synechococcus elongatus* PCC 7942; *P.*
trichocarpa, *Populus trichocarpa*; *A. thaliana*, *Arabidopsis thaliana*; *S.*
oleracea, *Spinacia oleracea*; *C. variabilis*, *Chlorella variabilis*; *C.*
reinhardtii, *Chlamydomonas reinhardtii*; *G. sulphuraria*, *Galdieria*
sulphuraria; *G. violaceus*, *Gloeobacter violaceus*; *G. kilaueensis*,
Gloeobacter kilaueensis; *M. marisnigri*, *Methanoculleus marisnigri*; *M.*
sediminis, *Methanoculleus sediminis*; *M. thermophilus*,
Methanoculleus thermophilus; *M. bourgensis*, *Methanoculleus*
bourgensis; *M. palustris*, *Methanosphaerula palustris*; *M. formicica*,
Methanoregula formicica; *M. boonei*, *Methanoregula boonei*; *M. liminatans*,
Methanofollis liminatans; *M. limicola*, *Methanoplanus limicola*; *M.*
petrolearius, *Methanoplanus petrolearius*; *M. hungatei*, *Methanospirillum*
hungatei; *M. tarda*, *Methanolinea tarda*; *M. concilii*, *Methanosaeta*
concilii; *M. thermophile*, *Methanosaeta thermophila*; *M. harundinacea*,
Methanosaeta harundinacea; *A. profundus*, *Archaeoglobus profundus*; *A.*
veneficus, *Archaeoglobus veneficus*; *G. ahangari*, *Geoglobus ahangari*; *G.*
acetivorans, *Geoglobus acetivorans*; *F. placidus*, *Ferroglobus placidus*; and
A. boonei, *Aciduliprofundum boonei*.

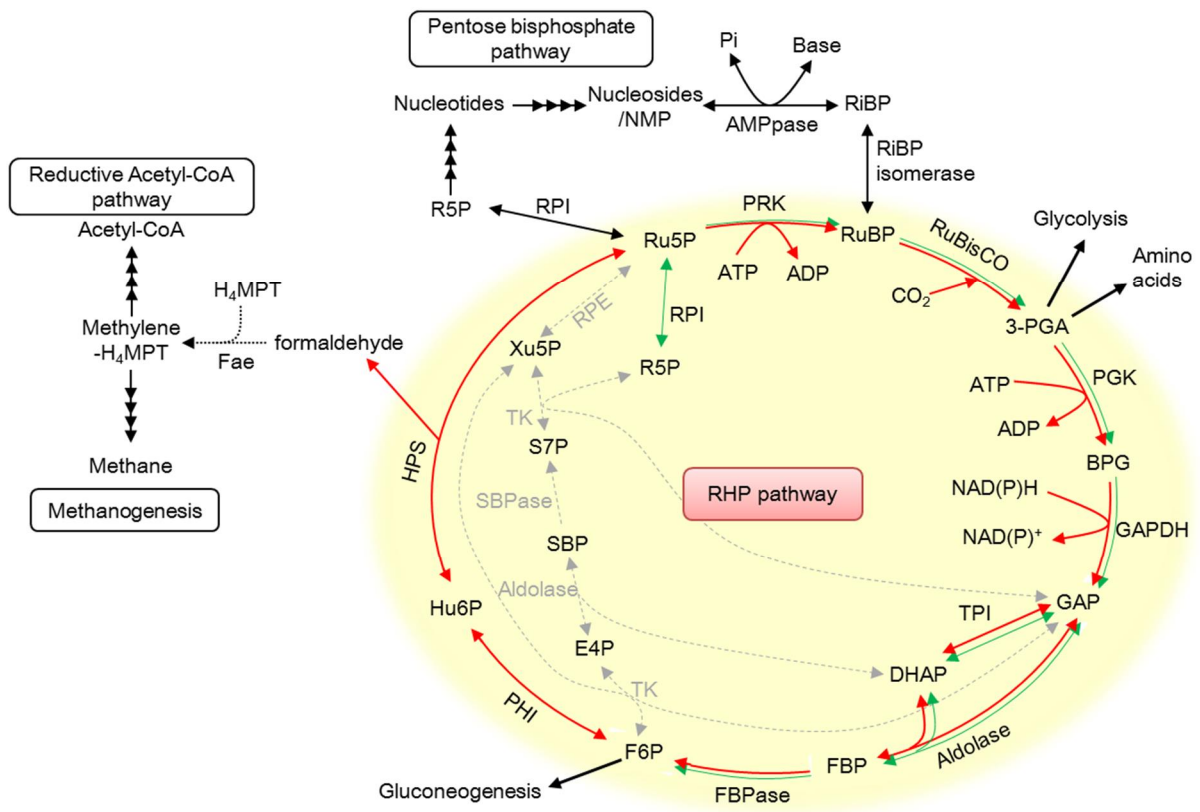


Fig. 2-16 アーキアにおける RHP 経路

(Modified from Kono et al., 2017)

RHP 経路 (黄色)の反応ステップを赤線で示す。また、カルビンサイクルと共通している反応ステップを緑線、RHP 経路で欠けているカルビンサイクルの反応ステップを灰色点線で示す。連続する黒矢印は複数の反応ステップを示す。RHP 経路から放出された formaldehyde は Fae によって、メタン合成経路及び還元的 acetyl-CoA 経路の中間代謝産物である methylene- H_4MPT へと合成されると考えている (黒点線、第 3 章)。PHI, 6-phospho-3-hexuloisomerase; HPS, 3-hexulose-6-phosphate synthase; Fae, formaldehyde activating enzyme; AMPpase, AMP phosphorylase; RiBP isomerase, ribose-1,5-bisphosphate isomerase; Hu6P, 3-hexulose-6-phosphate; NMP, nucleoside monophosphate; RiBP, ribose-1,5-bisphosphate; H_4MPT , tetrahydromethanopterin。その他の酵素略名、物質略名は Fig. 1-2 に準ずる。

第 3 章

M. hungatei における RuMP 経路酵素の解析

3-1. 序論

微生物の中には、methane や methanol、formaldehyde といった C1 化合物を炭素源として利用する、メチロトロフ細菌 (methylophil, C1 化合物資化性菌) と呼ばれるものがある (Yurimoto et al., 2005)。これらメチロトロフ細菌は様々な C1 化合物を利用することが報告されているが、基本的にいくつかの反応を経て formaldehyde を合成し、これを固定する。現在、glycine に固定する serine pathway (Van Dien and Lidstrom 2002)、xylulose-5-phosphate (Xu5P) に固定する XuMP pathway (Kato et al., 1982)、そして Ru5P に固定する RuMP pathway が報告されている (Yurimoto et al., 2005; Fig. 3-1)。Ru5P へ formaldehyde を固定し、Hu6P を合成する HPS と、Hu6P を F6P へ変換する PHI は、RuMP 経路特異的な酵素であり、鍵酵素とされている (Kato et al., 2006; Fig. 3-2)。近年、多くの生物種のゲノム解析により、メチロトロフ細菌のみが利用していると考えられていた RuMP 経路が、他の細菌からアーキアに至るまで、広く分布していることが分かってきた (Kato et al., 2006; Yurimoto et al., 2009)。本来の RuMP 経路は、Ru5P への formaldehyde の固定反応によって合成される F6P を解糖系や糖新生に供給し、酸化型ペントースリン酸経路 (Oxidative Pentose Phosphate pathway, OPPP) を介して、Ru5P の再生を行っている。しかし、ほとんどのアーキアにおいて OPPP は不完全であるため、formaldehyde 固定反応のアクセプター基質である Ru5P の合成経路が不明であり、アーキアにおける RuMP 経路の生理的意義は不明だった。2005 年、Soderberg や Goenrich らによって、アーキアは HPS と PHI の逆反応によって F6P から Ru5P を合成し、ribose 5-phosphate isomerase (RPI) によって ribose 5-phosphate (R5P) まで変換することで、核酸合成におけるリボース骨格を供給していることが予想された (Soderberg, 2005; Goenrich et al., 2005)。

M. hungatei のゲノム情報より、formaldehyde activating enzyme (Fae) ホモログと HPS ホモログが融合した、bifunctional enzyme として登録されている Fae-HPS ホモログ (Gene name: *Mhun1628*)、HPS ホモログと demethylmenaquinone methyltransferase (MenG) ホモログが融合した、

bifunctional enzyme として登録されている HPS-MenG ホモログ (Gene name: *Mhun0647*)、そして 2 つの PHI ホモログ (Gene name: *Mhun0910* (PHI-a), Gene name: *Mhun3031* (PHI-b)) を有していることが分かった (Fig. 3-3)。Fae はメタン合成経路の炭素キャリアである tetrahydro-methanopterin (H₄MPT) に formaldehyde を固定し、methylene-H₄MPT を合成する酵素であり (Goenrich et al., 2005)、MenG はメナキノン生合成の最後のステップを触媒する酵素である (Wissenbach et al., 1992)。

本章では、これら *M. hungatei* が持つ RuMP 経路酵素ホモログタンパク質が、それぞれ HPS, PHI としての触媒能力を有するのか、また、これまでの報告のように逆反応により予想している RHP 経路が進むのかを、大腸菌リコンビナントタンパク質を用いて解析を行った。

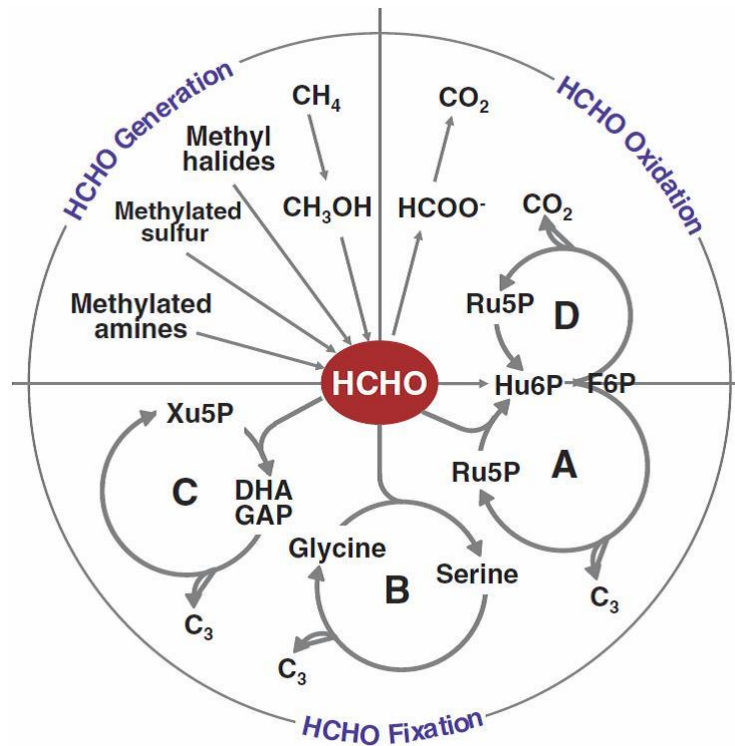


Fig. 3-1 メチロトロフ細菌における C1 化合物の代謝概略

(Yurimoto et al., 2005)

A, ribulose monophosphate pathway; B, serine pathway;
 C, xylulose monophosphate pathway; D, cyclic oxidative ribulose
 monophosphate pathway.

A, B, C はそれぞれ formaldehyde 固定経路として機能し、固定した formaldehyde から C₃ 化合物を合成する。一方 D は formaldehyde の解毒経路として機能し、固定した formaldehyde を酸化することで CO₂ として放出する。

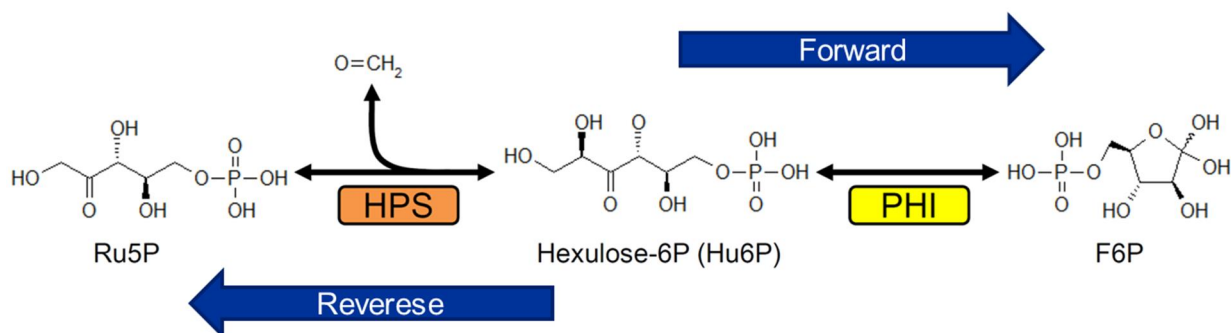


Fig. 3-2 RuMP 経路酵素の触媒反応 (Modified from Kato et al., 2006)

Forward 反応はメチロトロフ細菌において機能している炭素固定反応を示す。Reverse 反応はアーキアにおいて機能していることが予想されている、Ru5P の合成反応を示す。

HPS, 3-hexulose-6-phosphate synthase; PHI, 6-phospho-3-hexuloisomerase.

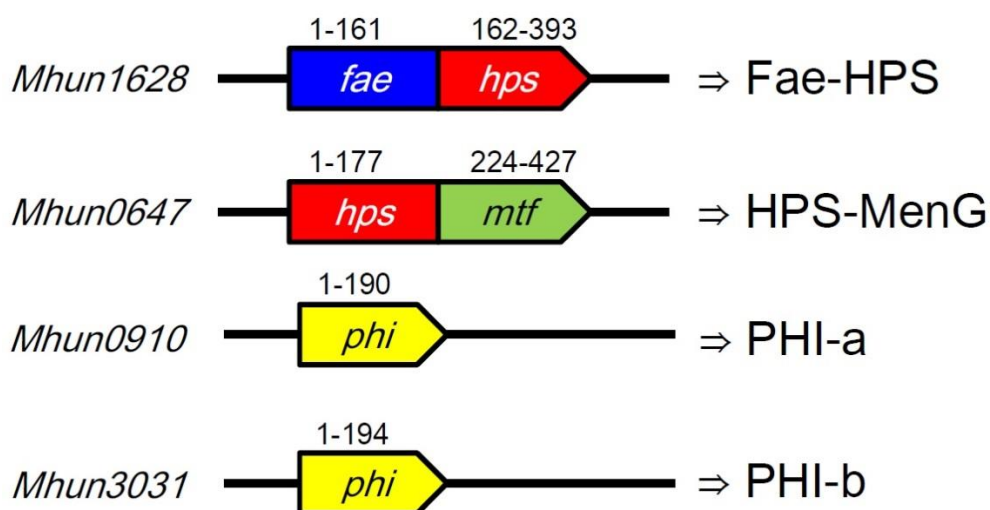


Fig. 3-3 *M. hungatei* の持つ RuMP 経路酵素ホモログ

左の斜体は遺伝子名、右に本文中で表記する略称を示す。

3-2. 材料と方法

3-2-1. His-tag を付加したリコンビナント HPS, PHI ホモログの発現系の構築

M. hungatei HPS 及び PHI ホモログの遺伝子配列情報は、KEGG より入手した。その情報をもとに、Primer Design tool for In-Fusion® HD Cloning Kit

(https://www.takara-bio.co.jp/infusion_primer/infusion_primer_form.php)

より、forward primer に *Xho*I、reverse primer に *Bam*HI サイトをそれぞれ付加した primer を設計した。

Primer name	Primer sequence (5'→3')
MhFaeHPS-F	GCTCGGTACCCTCGAGATGTATCTGATAGGCGAA
MhFaeHPS-R	GCTTGAATTCGGATCCTTAGAAATCAGTCATGATT
MhHPSMenG-F	GCTCGGTACCCTCGAGATGAACCGGTCTGTACTC
MhHPSMenG-R	GCTTGAATTCGGATCCTCAGGAATGTTTTTCCCAC
MhPHIa-F	GCTCGGTACCCTCGAGATGCAACTGATGGCGTCA
MhPHIa-R	GCTTGAATTCGGATCCTCACTCGATATTTGCATGC
MhPHIb-F	GCTCGGTACCCTCGAGATGTCCATGATGATCTCC
MhPHIb-R	GCTTGAATTCGGATCCTTATTGCATATTGGTATAC

2章で調製した *M. hungatei* のゲノム DNA を鋳型として、作製した各プライマーセットを用いて、PCR を行った。PCR は PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (Takara Bio Inc., Japan) を用いて行った。熱サイクルプログラムは以下の通りである：変性は 98°C, 10 sec、アニーリングは 55°C, 5 sec、伸長反応は 72°C, 10 sec を 30 サイクル行った。PCR 産物と制限酵素処理 (*Xho*I/*Bam*HI) を行った vector, pCold-1 (Novagen, USA) を、In-Fusion® HD Cloning Kit (Clontech, USA) により連結、*E. coli* DH5 コンピテントセルを形質転換した。得られた pCold1-MhHPS, pCold1-MhPHI-a, pCold1-MhPHI-b を ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer を用いて塩基配列に変異がないことを確認した。得られたこれらのプラスミドで、*E. coli* C43 (DE3) コンピテントセルを形質転換し、リコンビナントタンパク質発現株を作製した。

3-2-2. リコンビナント HPS, PHI ホモログの発現

各 His-tag 融合リコンビナントタンパク質の発現には *E. coli* C43 (DE3)を用い、50 μ g/ml ampicillin を含む LB 培地において、37 $^{\circ}$ C で培養したものを用いた。次に、培養液の OD₆₀₀ が 0.4~0.6 に達すると、培養液を 15 $^{\circ}$ C に冷却し、30 分間コールドショック発現誘導を行った。そして終濃度が 1 mM となるように IPTG を添加して、15 $^{\circ}$ C で 24 時間発現誘導を行った。菌体は遠心、4 $^{\circ}$ C, 3,500 g で回収し、-20 $^{\circ}$ C で保存した。

3-2-3. リコンビナント HPS, PHI ホモログの精製

リコンビナントタンパク質は 2-3-3 章と同様に、His-Bind resin を用いて精製、遠心濃縮を行った。タンパク質溶液は Tris buffer (20 mM Tris-HCl pH8.0)で平衡化した PD-10 column に通し、脱塩した。His-tag の切断は行わず、このタンパク質溶液を用いて酵素学的解析を行った。

3-2-4. *Mycobacterium gastris* HPS, PHI リコンビナントタンパク質の発現と精製

ポジティブコントロールとして、京都大学 由里本博士より、メチロトローフ細菌 *Mycobacterium gastris* MB19 由来の HPS, PHI の大腸菌リコンビナントタンパク質発現株を分与いただいた。これらの発現、精製は、論文に記載の通り行った (Orita et al., 2007)。精製したタンパク質は、終濃度 10%となるように glycerol を加え、-20 $^{\circ}$ C で保存した。

3-2-5. HPS, PHI 活性測定法 (Forward)

HPS 及び PHI の forward reaction は、触媒反応による Hu6P 及び F6P の生成速度をカップリング酵素の触媒反応による NADPH の増加速度をモニタリングすることにより測定した (Arfman et al., 1990 を一部改変)。反応混液 (50 mM Tris-HCl pH8.0, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM NADP⁺, 5 mM Ru5P, 1 units/ml G6PDH (Oriental yeast), 1 units/ml PGI (MP

Biomedicals, Inc., USA), 5 mM FA, MgHPS/PHI) に精製タンパク質を添加して全量 500 μ l とし、35°C で 340 nm の吸光度変化を U3300 spectrophotometer を用いて測定した。340 nm の増加の傾きと、NADPH の分子吸光係数 6.2×10^3 ($M^{-1} \times cm^{-1}$) を用いて、一分間あたりの Hu6P 及び F6P 生成量に換算して、精製タンパク質濃度から活性を算出した。

3-2-6. HPS, PHI 活性測定法 (Reverse)

HPS 及び PHI の reverse reaction は、触媒反応による Ru5P の生成速度をそれぞれ PRK 活性測定系とのカップリング反応系 (*Synechococcus* sp. PCC 7942 PRK (安達昇 2006) を使用) による NADH の減少速度をモニタリングすることにより測定した。反応混液 (50 mM Tris-HCl pH8.0, 5 mM MgCl₂, 0.2 mM NADH, 10 mM F6P) に精製タンパク質を添加して全量 500 μ l とし、35°C で 340 nm の吸光度変化を U3300 spectrophotometer を用いて測定した。340 nm の減少の傾きと、NADH の分子吸光係数 6.22×10^3 ($M^{-1} \times cm^{-1}$) を用いて、一分間あたりの Ru5P 生成量に換算して、精製タンパク質濃度から HPS, PHI 活性を算出した。PHI 反応の測定時には Fae-HPS ホモログを、HPS 反応の測定時には両 PHI ホモログをカップリング酵素として利用した。

また、長時間 (12 h) 反応させ、反応産物の蓄積を解析した。Ru5P に関しては、上記と同様に PRK 活性測定系と組み合わせることで、生成した Ru5P 量を算出した。また、formaldehyde に関してはアセチルアセトン法 (Nash, 1953) によって測定した。

3-3. 結果

3-3-1. *M. hungatei* HPS, PHI ホモログの forward reaction

精製した *M. hungatei* HPS, PHI ホモログについて、それぞれの触媒反応の有無を確かめるために、活性測定を行った。その結果、2つの *M. hungatei* HPS ホモログはそれぞれ HPS 活性 (HPS-MenG: 150 nmol/min/mg、Fae-HPS: 600 nmol/min/mg)を示した (Table 3-1)。しかし、2つの PHI ホモログ、PHI-a 及び PHI-b はそれぞれ単独では PHI 活性を示さず、2つの PHI ホモログが共存する場合のみ、顕著な PHI 活性 (480 nmol/min/mg)が検出された (Table 3-1)。

3-3-2. *M. hungatei* HPS, PHI ホモログの reverse reaction

M. hungatei が有する 2つの HPS ホモログ及び、2つの PHI ホモログがそれぞれ HPS 及び PHI 活性を示したため、次にこれらの酵素が可逆的に働くか、reverse reaction の測定を行った。その結果、HPS-MenG: 46 nmol/min/mg、Fae-HPS: 105 nmol/min/mg、PHI-a + -b: 12 nmol/min/mg と非常に低いながらも優位な活性を示し、これらの酵素が F6P から Ru5P と FA を生成する逆反応も触媒することが明らかになった (Table 3-1)。

また、より活性値の高い Fae-HPS と 2つの PHI を用いて長時間反応させたところ、顕著な Ru5P と FA の蓄積が検出された (Fig. 3-4)。このことから、これらの酵素は可逆的に働くことが証明され、F6P から Ru5P と FA を生成する反応を触媒できることが明らかになった。

Table 3-1 *M. hungatei* HPS, PHI ホモログの活性

Enzyme	Forward reaction Specific activity (nmol/min/mg)	Reverse reaction Specific activity (nmol/min/mg)
HPS-MenG	150	46
Fae-HPS	600	105
PHI-a	N.D.	N.D.
PHI-b	N.D.	N.D.
PHI-a + -b	480	12
<i>M. gastri</i> HPS	709,000 ^{*1}	N.T.
<i>M. gastri</i> PHI	5,630,000 ^{*1}	N.T.
<i>T. kodakaraensis</i> HPS-PHI ^{*2}	134,000 ^{*3}	20,900 ^{*3}
<i>M. barkeri</i> Fae-HPS ^{*4}	4,400 ^{*5}	N.T.

全てのデータは 25°C で測定された。

*1: Reference Data from Orita et al., 2007

*2: *T. kodakaraensis* は HPS-PHI bifunctional enzyme として有する

*3: Reference Data from Orita et al., 2006

*4: *Methanosarcina barkeri* は Fae-HPS bifunctional enzyme として有する

*5: Reference Data from Goenrich et al., 2005

N.D.: Not detected

N.T.: Not tested

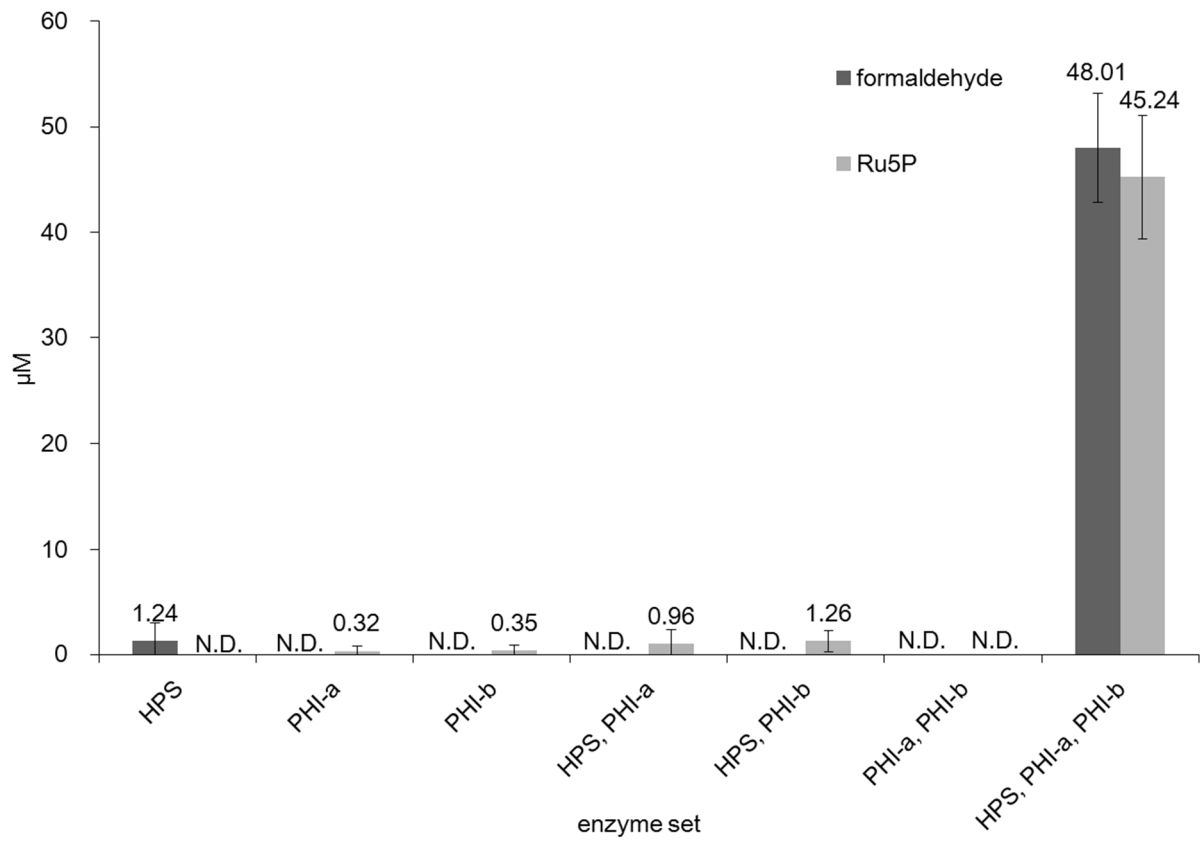


Fig. 3-4 Fae-HPS, PHI-a, -b の逆反応による反応産物の蓄積

これらの値は独立した 3 回の実験の平均値 \pm SD を示す。

N.D.: Not detected

3-4. 考察

3-4-1. *M. hungatei* における RuMP 経路酵素

これまで、いくつかのアーキアにおける RuMP 経路の報告がされてきた。アーキアの RuMP 経路酵素の存在形式は多様であり、一般的なメチロトロフ細菌のような HPS と PHI が独立した形式や、HPS ドメインと PHI ドメインが融合した bifunctional enzyme や、Fae ドメインと HPS ドメインが融合した bifunctional enzyme など、それらの酵素セットは、様々な形態をとる (Yurimoto et al., 2009)。一方、PHI が 2 つ存在する生物はこれまで報告されていなかった。

本章の実験結果から、*M. hungatei* が有する 2 つの HPS ホモログタンパク質、Fae-HPS と HPS-MenG は HPS としての触媒能力を持ち、その反応は可逆的であった。それぞれの bifunctional enzyme としての機能は不明だが、Fae-HPS に関してはこれまで報告されている Fae のアミノ酸配列と 50% 程度の相同性を示し、Fae としての formaldehyde 固定反応の触媒能力も有することが予想される。一方で HPS-MenG の MenG ドメインは PHI としてアノテーションされている場合もあるが、*M. hungatei* の HPS-MenG は PHI 活性を有しておらず、HPS-MenG が本来の MenG のような反応触媒能を有するのか、また、メナキノン合成経路との関連性は不明である。

これまでの PHI に関する報告では、PHI はホモ複合体として機能しているが (Yurimoto et al., 2005; Orita et al., 2007)、*M. hungatei* が有する 2 つの PHI は、それぞれ単独ではほとんど反応が進まず、2 つの PHI が共存する場合に顕著な PHI 活性が検出された (Table 3-1)。そのため、2 つの PHI それぞれがサブユニットであるか、ヘテロダイマーで活性を示すような新規 PHI であることが予想された。しかし、これら PHI を混合した状態での Native-PAGE やゲルろ過クロマトグラフィーを試みたが、ヘテロ複合体の形成や、それぞれ独立でアプライしたものとの変化は検出できず、現在までに構造的な機能解明はできていない。次章で行った *M. hungatei* 菌体粗酵素液のペプチド MS 解析では、PHI-a と PHI-b どちらも同定されたことから、どちらも生体内に共存しており、PHI 触媒能を発揮できる状態にある (Fig. 4-5)。PRK を有する 22 種のアーキアの内、*M. hungatei* を含む 10 種が 2 つの PHI ホモログ遺伝子を有しているが (Table 3-4)、これらの PHI についても報告は無く、

今後解析を行うことで、これらの特殊な PHI の機能を明らかにすることができる。

また、*M. hungatei* が有する HPS、PHI の活性値は、これまで報告されているものに比べて非常に低い (Table 3-1)。これが PRK を有するアーキアに特有な酵素特性なのか議論するために、*M. hungatei* 以外のアーキアが有する HPS、PHI ホモログの今後の解析が待たれる。

3-4-2. RHP 経路の分布

ゲノム解読が完了している、*M. hungatei* を含む 31 種のアーキアのゲノム情報より、RHP 経路、RuMP 経路、NMP 経路の酵素遺伝子を検索した (Table 3-4)。その結果、全て HPS、PHI を単体もしくは融合タンパク質として有しており、これらのアーキアにも RHP 経路が存在することが予想される。その中でも、*Aciduliprofundum boonei* 及び *Aciduliprofundum* sp.MAR08-339 も RHP 経路を持つことが予想されるが、これら 2 種のみ Fae を有していないため、RHP 経路が機能した際に放出される formaldehyde の行方が他の種とは異なる可能性が示唆された (Fig. 4-9)。

3-4-3. アーキアにおける RHP 経路の役割

M. hungatei 由来の 5 種類の大腸菌リコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* の実験結果から、RHP 経路における F6P から 3-PGA までの反応が進行可能であることを明らかにした。

アーキアは HPS と PHI の逆反応、reverse RuMP 経路を利用し、Ru5P を合成しているとされているが、この際に生体にとって毒性を示す formaldehyde が放出される。この formaldehyde を解毒するために、ほとんどのアーキアは Fae を利用している (Vorholt et al., 2000; Marx et al., 2003)。Fae は H₄MPT に formaldehyde を固定し、methylene-H₄MPT を合成する酵素であり、メチロトローフ細菌 *Methylobacterium extorquens* AM1 においては、ここからいくつかの反応を経て formaldehyde が CO₂ となり、体外に排出することで formaldehyde の解毒を行っていると考えられている (Vorholt, 2002)。

本研究で扱った 5 種のアーキアの内、4 種はメタン菌であり、これらはメタン合成経路を有しているため、Fae によって合成された methylene- H_4 MPT に結合している炭素はメタン合成経路、もしくは還元的 acetyl-CoA 経路へ利用されることが予想される (Fig. 2-16)。メタン合成へ利用される場合、炭素は methane として体外へ放出され、これに伴って ATP が合成される。一方、還元的 Acetyl-CoA 経路へ利用される場合、炭素が固定される。RHP 経路及び還元的 Acetyl-CoA 経路の代謝中間物質は、解糖系/糖新生やアミノ酸合成経路など、他の代謝経路へと繋がっている。これらのことから、RHP 経路は RuBisCO が固定した炭素の分配、または NMP 代謝経路など他代謝経路から得られた炭素源の再利用といった、アーキアにおける炭素代謝のハブ的役割を担っているのではないかと思われる。RHP 経路を有する 22 種の内、15 種はメタン菌であり、これらにおいても同じ役割であると考えている。残る *A. profundus* はメタン菌ではないが methane を生成しているという報告があり、メタン菌と同様に Methylene- H_4 MPT はメタン合成経路もしくは還元的 Acetyl-CoA 経路へ流れていく可能性が考えられる。

一方で Fae を持たないとされる好気好酸菌 *Aciduliprofundum* 属や、超好熱菌 *Archaeoglobus* 属、*Ferroglobus* 属、*Geoglobus* 属といったメタン菌以外のアーキアに関しては、その生態自体に不明な点が多いため、RHP 経路の役割も含め、今後の更なる解析が待たれる。

Table 3-4 アーキアにおける RHP 経路, RuMP 経路及び NMP 経路酵素のホモログ遺伝子の有無

Species	RHP cycle						
	PRK	RuMP pathway			NMP metabolic pathway		
		HPS	PHI	Fae	RuBisCO	AMPpase	RiBP isomerase
<i>A. boonei</i>		*2	*2	×			
<i>Aciduliprofundum</i> sp. MAR08-339		*2	*2	×			
<i>A. fulgidus</i>	×	*1, *2		*1			
<i>A. profundus</i>		*1, *2	*3	*1			
<i>A. veneficus</i>		*1, *2		*1			
<i>F. placidus</i>		*1, *2					
<i>G. acetivorans</i>		*1, *2		*1			
<i>G. ahangari</i>		*1, *2		*1			
<i>M. jannaschii</i>	×	*1		*1			
<i>M. burtonii</i>	×	*1					
<i>M. maripaludis</i>	×	*2	*2	×	×		
<i>M. bourgensis</i>		*1, *2	*3				
<i>M. marisnigri</i>		*1, *2	*3				
<i>M. sediminis</i>		*1, *2	*3				
<i>M. thermophilus</i>		*1, *2	*3				
<i>M. liminatans</i>		*1, *2	*3	*1			
<i>M. tarda</i>		*1, *2	*3	*1			
<i>M. limicola</i>		*1, *2	*3	*1			
<i>M. petrolearius</i>		*1, *2	*3	*1			
<i>M. boonei</i>		*1, *2		*1			
<i>M. formicica</i>		*1, *2		*1			
<i>M. concilii</i>		*1, *2	*2				
<i>M. harundinacea</i>		*1, *2	*2				
<i>M. thermophila</i>		*1, *2	*2	*1			
<i>M. barkeri</i>	×	*1, *2					
<i>M. palustris</i>		*1, *2		*1			
<i>M. hungatei</i>		*1	*3	*1			
<i>N. pharaonis</i>	×	×	×	×			

<i>P. horikoshii</i>	×	*2	*2	×			
<i>S. tokodaii</i>	×			×	×	×	
<i>T. kodakaraensis</i>	×	*2	*2	×			

*1: Fae-HPS として

*2: HPS-PHI として

*3: 2 つの PHI を有する

A. boonei, *Aciduliprofundum boonei*; *A. fulgidus*, *Archaeoglobus fulgidus*; *A. profundus*, *Archaeoglobus profundus*; *A. veneficus*, *Archaeoglobus veneficus*; *F. placidus*, *Ferroglobus placidus*; *G. acetivorans*, *Geoglobus acetivorans*; *G. ahangari*, *Geoglobus ahangari*; *M. jannaschii*, *Methanocaldococcus jannaschii*; *M. burtonii*, *Methanococcoides burtonii*; *M. maripaludis*, *Methanococcus maripaludis*; *M. bourgensis*, *Methanoculleus bourgensis*; *M. marisnigri*, *Methanoculleus marisnigri*; *M. sediminis*, *Methanoculleus sediminis*; *M. thermophilus*, *Methanoculleus thermophilus*; *M. liminatans*, *Methanofollis liminatans*; *M. tarda*, *Methanolinea tarda*; *M. limicola*, *Methanoplanus limicola*; *M. petrolearius*, *Methanoplanus petrolearius*; *M. boonei*, *Methanoregula boonei*; *M. formicica*, *Methanoregula formicica*; *M. concilii*, *Methanosaeta concilii*; *M. harundinacea*, *Methanosaeta harundinacea*; *M. thermophila*, *Methanosaeta thermophila*; *M. barkeri*, *Methanosarcina barkeri*; *M. palustris*, *Methanosphaerula palustris*; *M. hungatei*, *Methanospirillum hungatei*; *N. pharaonis*, *Natronomonas pharaonis*; *P. horikoshii*, *Pyrococcus horikoshii*; *S. tokodaii*, *Sulfolobus tokodaii*; *T. kodakaraensis*, *Thermococcus kodakaraensis*.

第 4 章

Methanospirillum hungatei 菌体を用いた解析

4-1. 序論

メタン菌は絶対嫌気性で、一部の種はギ酸や酢酸、メタノールなどを炭素源として利用するが、ほとんどのメタン菌は CO_2 と H_2 からメタン生成を行い、その反応過程で形成するイオン勾配によって ATP synthase を動かし、エネルギーを生産している (Deppenmeier et al., 1996)。*M. hungatei* は酢酸も利用できるが、基本的には CO_2 と H_2 のみで生育でき、固定した CO_2 の 99% はメタン生成に使われ、acetyl-CoA に固定されたわずかな CO_2 により pyruvate が合成される (Ekiel et al., 1983; Berg et al., 2010)。また、メタン菌は 15°C で生育する *Methanogenium fngidum* を始めとし、 37°C で生育する *M. hungatei* や *M. concilii*、 122°C で生育可能な *Methanopyrus kandleri* まで、生育温度が幅広い (Franzmann et al., 1997; Takai et al., 2008)。メタン菌は基本的に独立栄養性だが、バクテリアと共生しているケースも知られている (Worm et al., 2011)。

第 3 章までの実験結果から、これまでに同定されていた光合成型 PRK に加え、アーキア型 PRK の存在を明らかにし、このアーキア型 PRK 及び RuBisCO が働き得ると考えられる新規炭素代謝経路を提唱した。しかし、これらは全て大腸菌リコンビナントタンパク質を用いた解析結果であり、アーキア生体内で実際に機能しているかという疑問が残る。そこでアーキアの培養を行い、菌体そのものを用いることで *in vivo* に相当する解析を目指した。

本研究室にはアーキアの培養に関する設備が無かったため、木村浩之博士 (静岡大学理学研究科) の協力の下、*M. hungatei* の培養を行った。その後、蘆田弘樹博士 (神戸大学人間発達環境学研究科) の協力の下、*M. hungatei* の継代培養及び大量培養を試みた。本章では *M. hungatei* の菌体粗酵素溶液を用いて、これまで *in vitro* で明らかにしてきた RHP 経路の酵素反応の検出を試みた。さらに、蓮沼誠久博士ら (神戸大学自然科学系先端融合研究環) との共同研究によって、*M. hungatei* のメタボローム解析を行った。

4-2. 材料と方法

4-2-1. *M. hungatei* の培養

M. hungatei JF-1 strain (JCM no. 10133)は、JCM (RIKEN, Japan Collection of Microorganisms)より入手した。培養はJCMの推奨している JCM242 medium (http://www.jcm.riken.jp/cgi-bin/jcm/jcm_grmd?GRMD=242)を用いた。70 ml のバイアル瓶に 30 ml の培地、40 ml の H₂-CO₂ 混合ガス (4:1)を 150 kPa で封入し (ガス置換装置 GR-8, 三紳工業)、37 °C で 2 週間培養を行った (Iino et al., 2010; Fig. 4-1)。菌体は 4°C, 5,000 g で遠心回収し、-20°C で保存した。

4-2-2. *M. hungatei* 菌体粗酵素溶液の獲得

回収した菌体ペレットに破砕 buffer (50 mM Tris-HCl pH7.5, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, Roche cOmplete, EDTA-free (protease inhibitor))を加え、超音波破砕によって菌体を破砕した。その後、遠心分離 (20,000 g, 30 min, 4°C)によって得られた上清を、*M. hungatei* 菌体粗酵素溶液とし、以降の実験に用いた。

4-2-3. *M. hungatei* 菌体粗酵素溶液による PRK の活性測定

PRK の活性測定は、リコンビナントタンパク質使用時と同様の系で行った (2-2-4 参照)。

4-2-4. *M. hungatei* 菌体粗酵素溶液による 3-PGA 生成の観察

RuBisCO の carboxylase 反応由来の 3-PGA 生成の検出は、Sulpice らの手法を一部改変して行った (Sulpice et al., 2007)。測定混液 400 μl (100 mM HEPES-KOH pH8.0, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM NADH, 5 mM ATP, 22.5 units/ml PGK (Sigma-Aldrich, USA), 20 units/ml GAPDH (Sigma-Aldrich), 2 units/ml TPI (Sigma-Aldrich), 1.5 units/ml G3PDH

(TOYOBO, Japan), 20 units/ml G3POX (TOYOBO, Japan))に基質溶液 160 μ l 3-PGA (Sigma-Aldrich), 40% ethanol)を加えて 10 分後の 340 nm の吸光度変化をプロットし、3-PGA 濃度による検量線を作成した (Fig. 4-3 a)。

菌体粗酵素溶液は 5 mM $MgCl_2$, 50 mM $NaHCO_3$ 存在下で 30°C, 20 min 活性化した。Carboxylase 反応液 (80 mM HEPES-KOH pH8.0, 15 mM $MgCl_2$, 50 mM $NaHCO_3$, 5 mM RuBP, 0.1 mg/ml CA (Sigma-Aldrich), 0.1 units/ml Protocatechuate 3,4-dioxygenase (TOYOBO, Japan), 4 mM protocatechuate, 5 mM RuBP あるいは 10 mM F6P, 活性化菌体粗酵素溶液)を 37°C で 2 h 反応させ、等量の 80% EtOH を添加して酵素反応を止めた。3-PGA 検量線と同様に測定混液 400 μ l に対して反応液 160 μ l を加え、10 分後の吸光度変化量と 3-PGA 検量線から生成 3-PGA 量を算出した。

CABP 処理は、活性化菌体粗酵素溶液 140 μ l に 20 mM CABP を 5 μ l 添加し、30°C, 10 min インキュベーションして行った。

4-2-5. *M. hungatei* 菌体粗酵素溶液のペプチド MS 解析

M. hungatei 菌体粗酵素溶液のペプチド MS 解析は、奈良先端科学技術大学院大学バイオ技術補佐員・倉田理恵様のご協力により行った。菌体粗酵素溶液、10 μ g/lane を既製ゲル (ATTA, e-PAGELE-T12.5L) にアプライし、22 mA で 70 min 泳動した。次に固定液 (50% methanol, 10% acetate) に 90 min 浸した後、CBB 染色液 (0.25% CBB R250, 5% methanol, 7.5% acetate) に浸して 45 min 染色した。脱色液 (25% methanol, 7.5% acetate) に浸して O/N で脱色した。さらに dH_2O に換え、1 h 振とうした。以下のサンプル調製は、植物グローバル教育プロジェクトで公開されているプロトコールを基に行った

(<http://bsw3.naist.jp/plantglobal/protocol/index.shtml>)。ゲルを 6 分割し (Fig. 4-4)、脱 CBB 液 (50% Acetonitrile、25 mM Ammoniumbicarbonate) に浸してゲルが透明になるまで CBB を完全に脱色した。ゲルを洗浄後、100 μ l 還元溶液 (10 mM DTT、50 mM Ammoniumbicarbonate) を加え、56°C、45 min 振とうし、還元した。サンプルを冷ました後、還元溶液を取り除き、100 μ l アルキル化溶液 (55 mM 2-iodoacetamide (IAA)、50 mM Ammoniumbicarbonate) を加え、アルミホイルで遮光しながら室温で

30 min 振とうし、アルキル化を行った。ゲルを洗浄し、O/N トリプシン消化を行った。消化液を回収し、ゲル片に回収液を加えて、再度ペプチド抽出を行った。これまで回収したサンプル溶液を合一し、夾雑物除去のため Ultra free-MC 0.45 mm Filter Unit (Millipore) にかけた。このフィルターろ過後の液をサンプルとして LC-MS 分析を行った。

LC-MS 分析は Paradigm MS4 (AMR)、C18 逆相カラムを用いた疎水性相互作用の差による Liquid Chromatography を行い、LTQ-Orbitrap XL (Thermo Scientific) による Mass Spectrometry を行った。検出されたデータの解析には Mascot (Matrix Science) を用いた。カットしたゲルごとに、*M. hungatei* のデータベース (RHP 経路の構成酵素のアミノ酸配列) に対する解析結果を出した。

4-2-6. ^{13}C を用いた *M. hungatei* のメタボローム解析

M. hungatei のメタボローム解析は、蓮沼誠久博士、松田真実研究員 (神戸大学自然科学系先端融合研究環) に協力していただいた。これまで蓮沼博士らが光合成生物のカルビンサイクルの代謝産物を測定していた手法に基づき、解析を行った (Hasunuma et al., 2013)。

In vivo での ^{13}C 標識は、 $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ (Cambridge Isotope Laboratories, MA, USA) を用いて行った。*M. hungatei* は前述したように、JCM242 培地で 37°C で 2 週間培養を行った。4 本の培養バイアル (計 120 mL の培養液、約 4 mg の乾燥菌体重量に相当) を 100% H_2 ガスで置換することで CO_2 を除去し、150 kPa で再度加圧した後に、シリンジを用いて 7.5% $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ 溶液を 2 mL 加えた。1, 3, 5, 10 min 標識した後、遠心分離 (10,000 g, 5 min, 4°C) によって *M. hungatei* 細胞を回収し、さらに氷冷 50 mM Tris-HCl (pH8.0) で洗い、再度遠心分離 (10,000 g, 5 min, 4°C) した。得られた菌体に 1 mL の 99.7% メタノール (30°C) を加え、20 sec ボルテックスにかけることで細胞を破碎した。400 μL の氷冷 H_2O 、1 mL の氷冷クロロホルムを加え、再度 30 sec ボルテックスにかけ、遠心分離 (20,000 g, 5 min, 4°C) した。得られた上清を Amicon Ultra-0.5 (3K) 遠心フィルター (Merck Millipore) で遠心濾過した (20,000 g, 15 min, 4°C)。濾過したもの 300 μL に内部標準 (2 μL 4 mM l-methionine sulfone, 2 μL 4 mM PIPES sesquisodium salt, 2 μL of 10 mM (1S)-(+)-10-camphor sulfonic acid) を加え、液体窒素で冷却した後に凍結乾燥を行った。凍結乾燥し

たものを 20 μL の MilliQ 水で再溶解したものを測定サンプルとした。

Capillary electrophoresis-mass spectrometric (CE/MS)解析は Agilent G7100 CE システム、Agilent G6224AA LC/MSD timeof-flight (TOF) システムおよび、シース液送液に 1:100 スプリッタを備えた Agilent 1200 シリーズ・Isocratic HPLC pump を使用した。システム制御には Agilent ChemStation (for CE)、データ収集には MassHunter (for Agilent TOFMS) をそれぞれ使用した。

4-3. 結果

4-3-1. *M. hungatei* の培養及び菌体粗酵素溶液の調整

菌体粗酵素溶液を用いた実験を行うために、*M. hungatei* の培養及び菌体粗酵素溶液の調製を行った。菌体の増殖状況は培養機器の性質上、O.D.で評価できなかつたため、ガスクロマトグラフィーによって気相の methane ガス生成量を解析することで評価した。植菌 3 日後に解析したところ、植菌を行わなかつたネガティブコントロールでは methane は検出されず、植菌を行ったものだけ methane の生成が観察された。この後、飯野らが行つた *M. hungatei* の培養期間を参考に、2 週間培養を行った (Iino et al., 2010)。結果として、30 ml の培地 2 本分の菌体ペレットから、タンパク質濃度約 1.5 mg/ml の菌体粗酵素溶液、1 ml が得られた。SDS-PAGE による確認を行ったところ、可溶性タンパク質の調製に成功した (Fig. 4-2)。以降の実験は、この菌体粗酵素溶液を用いて行った。

4-3-2. *M. hungatei* 菌体粗酵素溶液による RuBisCO 及び PRK 活性測定

得られた *M. hungatei* 菌体粗酵素溶液を用いて、RuBisCO の carboxylase 活性及び PRK 活性測定を行った。その結果、RuBisCO の carboxylase 活性である 3-PGA 生成 (20.53 nmol/mg) と PRK 活性 (84.14 nmol/min/mg) を示した (Fig. 4-3; Table 4-1)。

4-3-3. *M. hungatei* 菌体粗酵素溶液を用いた部分的 RHP 経路の解析

4-3-2 で得られた 3-PGA の生成が、RuBisCO の carboxylase 活性由来であることを確認するために、RuBisCO 反応阻害剤である CABP 処理による影響を解析した。*M. hungatei* RuBisCO が CABP によって活性阻害を受けることは、リコンビナントタンパク質を用いた実験で確認済みである (Table 2-4)。その結果、CABP 処理をした菌体粗酵素溶液では RuBP から 3-PGA の生成が検出されず、4-3-2 で得られた結果は RuBisCO の carboxylase 反応によることが証明された (Fig. 4-3 b)。

次に、菌体粗酵素溶液中に存在している酵素によって、RHP 経路中の F6P から 3-PGA までの反応が進むのか、解析を行った。その結果、微量ではあるが 80 nmol の F6P から 2.8 nmol/mg の 3-PGA 生成が検出された。CABP 処理を行った際には 3-PGA は検出されず、この反応は RuBisCO 反応依存であることが示された (Fig. 4-3 b)。

4-3-4. *M. hungatei* 菌体粗酵素溶液のペプチド MS 解析

これまで菌体粗酵素溶液を用いた実験によって RHP cycle 酵素の活性が得られたが、実際にそれぞれの酵素が、菌体粗酵素溶液中に存在しているという強い確証を得るために、タンパク質レベルでの発現解析としてペプチド MS 解析を行った。その結果、粗酵素溶液中に RuBisCO、Fae-HPS、HPS-MenG、PHI-a 及び PHI-b が存在していることを明らかにした (Fig. 4-4, 4-5)。一方、PRK は活性測定で検出できていたものの、ペプチド MS 解析では同定できなかつた。これは PRK のタンパク質量が低く、他の発現量が多いタンパク質のバンドと重なったために、同定できなかつた可能性が高いと考えられる。

4-3-5. *M. hungatei* のメタボローム解析

実際に *M. hungatei* 生体内で RHP 経路が存在し、機能している確証を得るために、メタボローム解析を行った。まず、代謝物がどの程度存在しているのか確認するために、非標識状態でのメタボローム解析を行った。その結果、RHP 経路の中間体のほとんど (Ru5P, 3-PGA, FBP, F6P) が検出されたが、RuBP, GAP 及び DHAP は検出限界以下であり、検出できなかつた (Fig. 4-6)。また、Hu6P は標準物質がないため、BPG は光合成生物でも検出が難しいことから、解析は行わなかつた。*M. hungatei* におけるこれらの代謝物量は、カルビンサイクルを利用する光合成生物と比較すると非常に低く (Hasunuma et al., 2010)、そのプールサイズも非常に小さいことが示唆された。

次に、 $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ を用いて代謝物の ^{13}C ラベリングを行い、時間経過による ^{13}C 標識率を 18 種の代謝物に対して解析を行った。その結果、11 種の物質で標識率の上昇が見られ、特に PEP, F6P, 3-PGA, 2-PGA に

において顕著な上昇が見られた (Fig. 4-7)。その中でもプールサイズと標識率のイニシャルスロープより、3-PGA が *M. hungatei* におけるメジャーな初発 CO₂ 固定産物であることが示唆された。3-PGA に引き続き、FBP, F6P への顕著な ¹³C 標識と、微量ながら Ru5P への ¹³C 標識が確認できた (Fig. 4-7, 4-8)。しかし、RuBP はそもそもピークを捉えられず、非常にプールサイズが小さいことを予想しており (Fig. 4-6)、¹³C 標識も見られなかった。

Gas phase:
40 ml of H₂/CO₂ (4 : 1; 150 kPa)

Medium:
30 ml of JCM242 medium



Fig. 4-1 *M. hungatei* の培養容器と条件

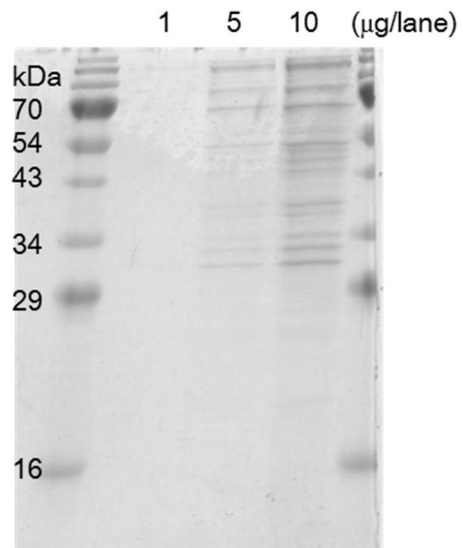


Fig. 4-2 *M. hungatei* 菌体粗酵素溶液の SDS-PAGE

左から各レーンに菌体粗酵素を 1、5、10 µg アプライした。

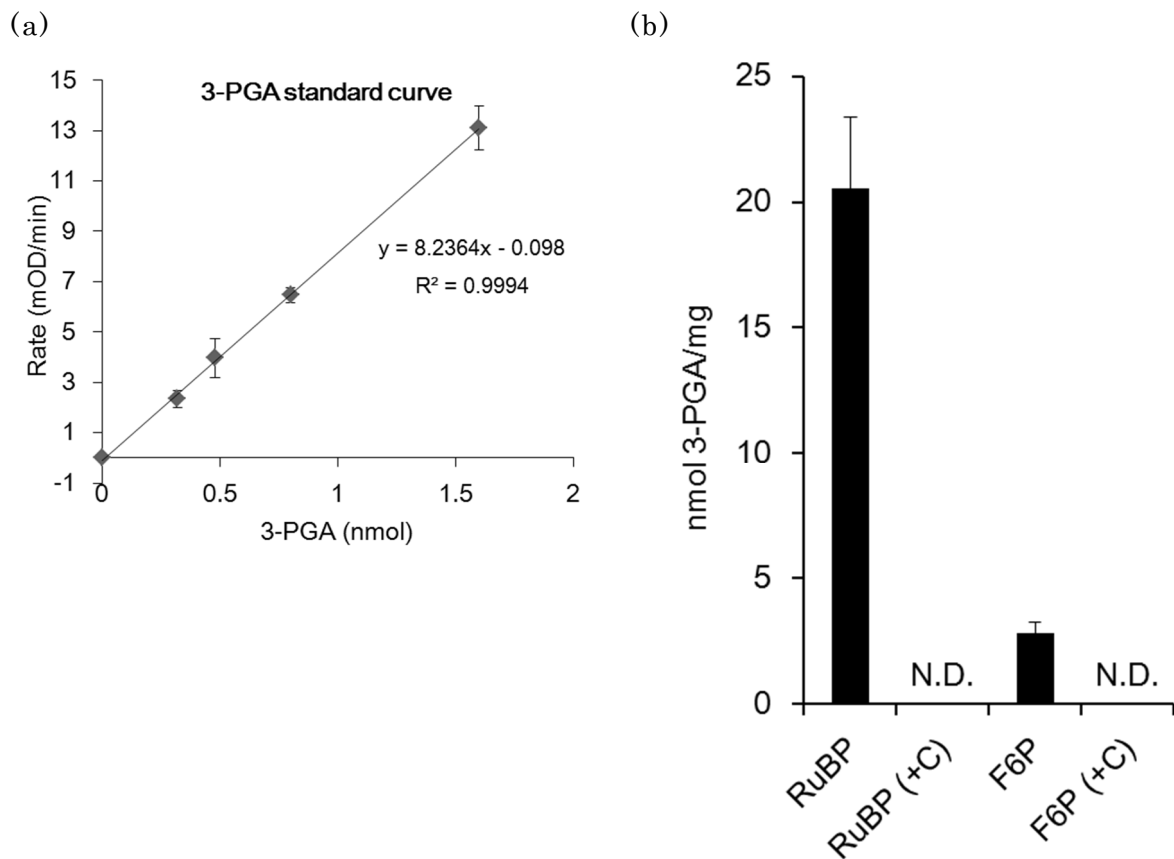


Fig. 4-3 *M. hungatei* 菌体粗酵素溶液による 3-PGA 生成

(a) 生成 3-PGA の定量に用いた 3-PGA 濃度検量線。検量線は独立した 3 回の測定の平均値 \pm SD によって作成した。

(b) *M. hungatei* 菌体粗酵素溶液による 3-PGA 生成量。40 nmol RuBP 及び 80 nmol F6P からの、添加タンパク質量あたりの 3-PGA 生成量を、(a)で作製した検量線をもとに算出した。(+C)は CABP 処理したサンプルを示す。これらの値は独立した 3 回の実験の平均値 \pm SD を示す。

N.D.: Not detected

Table 4-1 *M. hungatei* 菌体粗酵素溶液による PRK の活性値

Enzyme	Purified protein (nmol/min/mg protein)	Cell extract (nmol/min/mg crude protein)
PRK	29,170 ± 550 *	84.14 ± 8.32

*: 2 章で明らかにした精製酵素による数値

これらの値は独立した 3 回の実験の平均値±SD を示す。

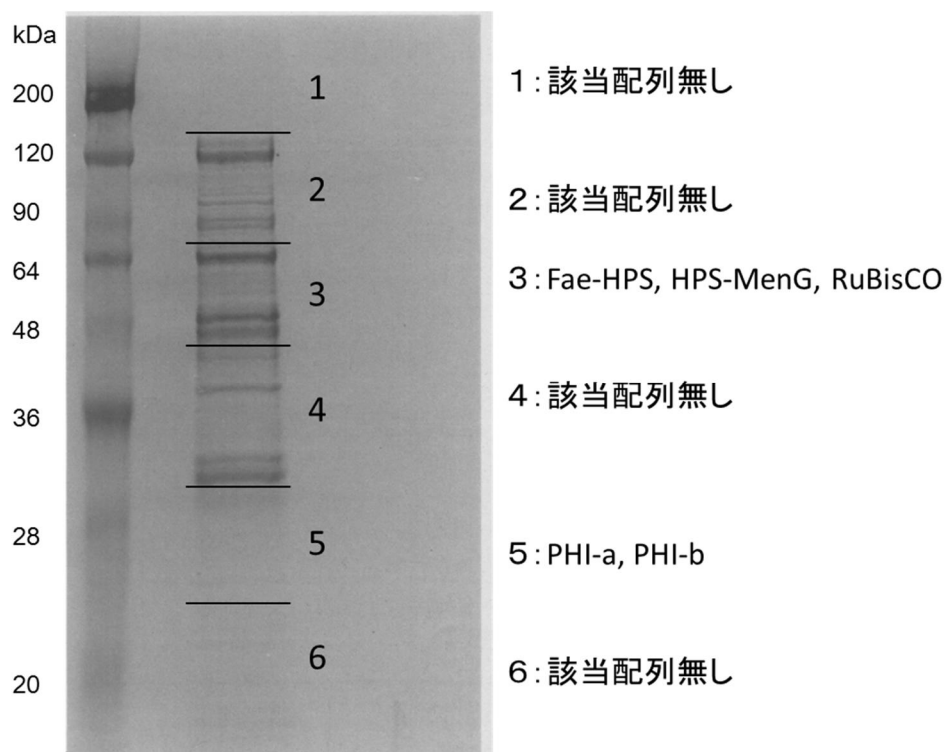


Fig. 4-4 *M. hungatei* 菌体粗酵素溶液のペプチド MS 解析に用いた SDS-PAGE

図に示したようにゲルを 6 分割し、それぞれサンプル調製を行い LC-MS 分析に用いた。

それぞれのゲル断片から検出されたペプチド配列に相当するタンパク質を右列に示す。

(a)

Accession No: Q2FSY4

Protein Name: Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit

Score: 292

>Mhun2315 (RuBisCO)

MTDVIATYYFRPREGVTP EWAAQAIAEEQTTGTWTDISTRQ NYVHYLDG VVDEIHPSGGG 60
YTCTIRYPSEIFEPGNIPQYLSVLAGNLFGLSRIAAVRLVDVEFSRDIVPFKGPKEFGIEG 120
VRKLAGTVDRPHVGTIIKPKVGLNPKDTAAVAYEAAIGGVDLIKDDETLTDQAF CPLGER 180
LPLIMEQLDRVKSETGRNVLYAVNISSAGDKIVQRAREAAARMGANMLMIDVIVCGF DAVR 240
AVAEEPGINLPIHVHRTMHAAITRNPEHGIAMRPCRLVRMLGGDQLHTGT VSGKMEHDV 300
TELRGDNLALTEPFFDLKPTFPVASGGLHPGGVHKEVSMLGRDIILQAGGGI HGHDPGTR 360
VGATAMRQAVDAAVAGISPATYAEDHPELKRALDKWGIA 399

(b)

Accession No: Q2FUB5

Protein Name: Phosphoribulokinase

Score: not detected

>Mhun0794 (PRK)

MSQPENFREVIRHSPLVYLIGVAGDSGSGKSTFTRAISDIFGEELVSSITVDDYHLYDRK 60
TRSEMGITPLLHTANLKLLEENLMDLKAGRTIQKPVYLHDHGTGFEPELFSPTKFIIE 120
GLHPYATKSLRALYDYTIFVDPERDVKYDWKIRRDMMKRNVDKNEVLREILQREPDYFQY 180
VFPQREVADAVIQISYSSYGKEEGEKRNVYRVMLSMQAQYCFEDIELNIDLCDL FKKSS 240
HDFSLSCSISHTPDSRNMALVVDGELMPDTIHKIERQIEFQTGISPINIFRGQE HITGTD 300
LVRLILSWQIINGRIALS NHLDQ 323

(c)

Accession No: Q2FQ74

Protein Name: Bifunctional enzyme fae/hps

Score: 579

>Mhun1628 (Fae-HPS)

MYLIGEALIGEGSELAHVLDLIVGDKNGPVGMAFANALSQLSAGHTPLLAVVRPNLLTKPA 60
TVVIPKVTLKNEGQVNQMFGPVQA AVAKA VADAVEEGLFGDININDICILASAF LHPSAK 120
DYNRIYRYNYGATKLAISR AFEEFPDEKTLIHEKDRAAHAVMGFKV PRLWDPPYLQVALD 180
IVDLGKLRVLSLSPENDHLIIEAGTPLIKKFG LNVISEIRAVKPNAFIVADMKILD TGN 240
LEARMAADSSADAVVMSGLAPASTIEKAITEARKTGIYSVIDMLNVEDPVGLIASLKV K 300
DIVELHRAIDAEHTSHAWGNIGDIKKAAGGKLLVATAGGIRVPVVK EALKTGADILVGR 360
AITASKDVRHAAEEFLEQLNKEEIDQFRIMTDF 393

(d)

Accession No: Q2FLC4

Protein Name: 3-hexulose-6-phosphate synthase

Score: 18

>Mhun0647 (HPS-MenG)

MNRSVLQVALDLVELDRAITIAGEAVLGGADWLEVGTPLIKSEGMRAVSALKSAFPDRQI 60
IADMKTADTGAIEVEMAAKSGADIVCVLGASDNSVIAESVRAARKYGVKIMADLISVNP 120
SGRAGELEQLGVDYICAHTGIDQQMTGTDSL DLLMKVIREVSIPVAAAGGISEKTAPGAI 180
AAGASIVVGGSIIRSSDVTGSTRRIKEAMNQVPYAGPDISQEDEIREILRYVSSSNVS 240
DAMHRKGAMSGMIPLCPGTKAVGKAVTVQTFAGDWAKPVEAIDIALPGDVIVINNDKGTH 300
VAPWGELATISCLNRGISGVIIDGAVRDVDDIKKMQYPLWSTAMVNPAGEPKGFGEIGSE 360
IQCGGQTVNPGDWIIADESGVVVVPKTRAYEIRRRAKEVYNTELRRIRQELKQGKTL SQVM 420
NLLRWEKHS 429

(e)

Accession No: Q2FQ74

Protein Name: Bifunctional enzyme fae/hps

Score: 579

>Mhun1628 (Fae-HPS)

MYLIGEALIGEGSELAHVLDLIVGDKNPVGMAFANALSQLSAGHTPLLA VVRPNLLTKPA 60
TVVIPKVTLKNEGQVNQMFQVQA AVAKAVADAVEEGLFGDININDICILASAF LHPSAK 120
DYNRIYRYNYGATKLAISR AFEFFPDEKTLIHEKDRAAHAVMGFKV PRLWDPPYLQVALD 180
IVDLGKLRVLSLSPENDHLIIEAGTPLIKKFG LNVISEIRAVKPNAFIVADMKILDTGN 240
LEARMAADSSADAVVMSGLAPASTIEKAITEARKTGIYSVIDMLNVEDPVGLIASLKV KP 300
DIVELHRAIDAEHTSHAWGNIGDIKKAAGGKLLVATAGGIRVPV VKEALKTGADILV VGR 360
AITASKDVRHAAEEFLEQLNKEEIDQFRIMTDF 393

(f)

Accession No: Q2FLC4

Protein Name: 3-hexulose-6-phosphate synthase

Score: 18

>Mhun0647 (HPS-MenG)

MNRSVLQVALDLVELDRAITIAGEAVLGGADWLEVGTPLIKSEGMRAVSALKSAFPDRQI 60
IADMKTADTGAIEVEMAAKSGADIVCVLGASDNSVIAESVRAARKYGVKIMADLISVNP 120
SGRAGELEQLGVDYICAHTGIDQQMTGTDSL DLLMKVIREVSIPVAAAGGISEKTAPGAI 180
AAGASIVVGGSIIRSSDVTGSTRRIKEAMNQVPYAGPDISQEDEIREILRYVSSSNVS 240
DAMHRKGAMSGMIPLCPGTKAVGKAVTVQTFAGDWAKPVEAIDIALPGDVIVINNDKGTH 300
VAPWGELATISCLNRGISGVIIDGAVRDVDDIKKMQYPLWSTAMVNPAGEPKGFGEIGSE 360
IQCGGQTVNPGDWIIADESGVVVVPKTRAYEIRRRAKEVYNTELRRIRQELKQGKTL SQVM 420
NLLRWEKHS 429

Fig. 4-5 *M. hungatei* 菌体粗酵素溶液のペプチド MS 解析

ペプチド MS で同定されたペプチド断片と RHP cycle 酵素のアミノ酸配列を照合した。Mascot 解析で得られた total protein score と、一致した残基を赤で示す。

(a) RuBisCO, (b) PRK, (c) Fae-HPS, (d) HPS-MenG, (e) PHI-a, (f) PHI-b

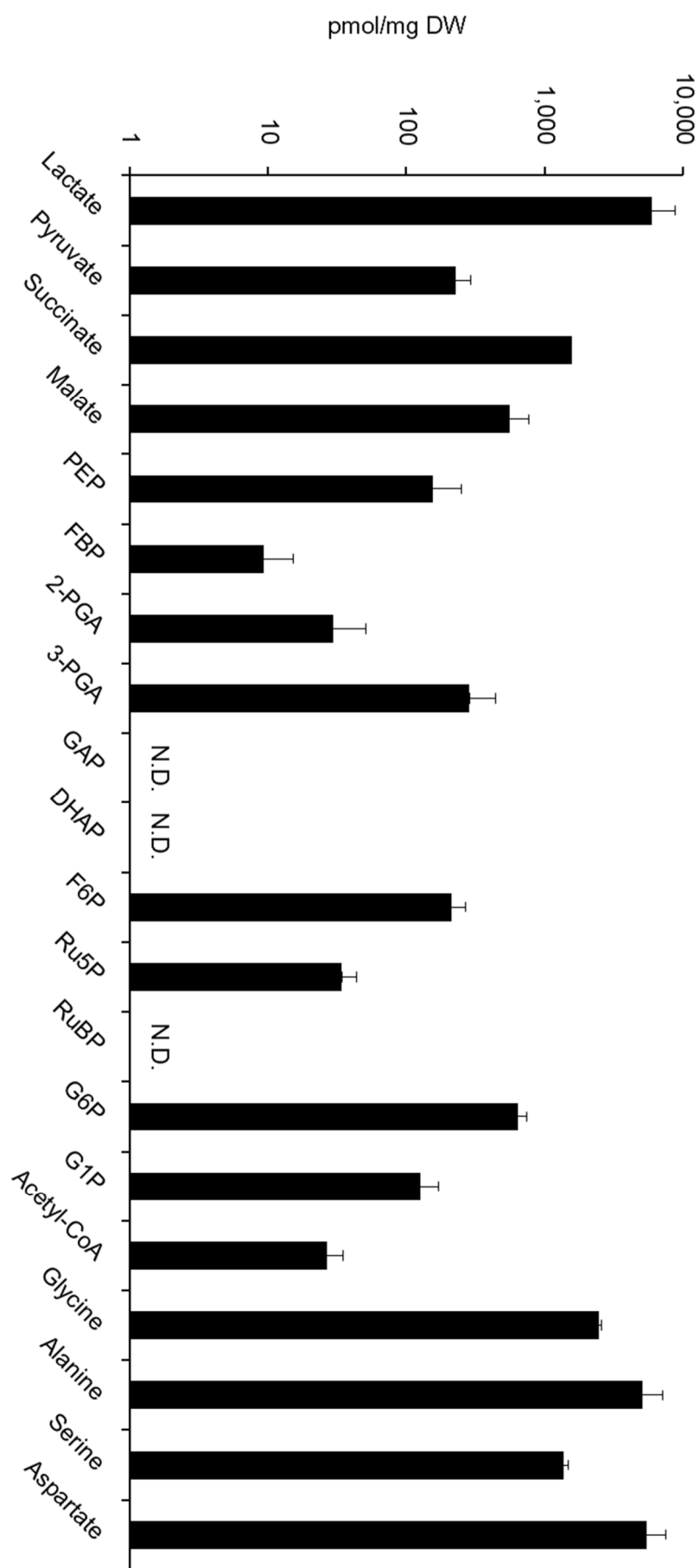


Fig. 4-6 *M. hungatei* 菌体内における代謝物のプールサイズ

¹³C 標識を行っていない状態での代謝物のプールサイズ。代謝産物量はそれぞれ標準物質の検量線から算出され、乾燥菌体重量あたりの数値とした。これらの値は独立した 2 回の実験の平均値 ±SD を示す。

N.D.: Not detected

PEP, phosphoenolpyruvate; 2-PGA, 2-phosphoglycerate; G6P, glucose-6-phosphate; G1P, glucose-1-phosphate.

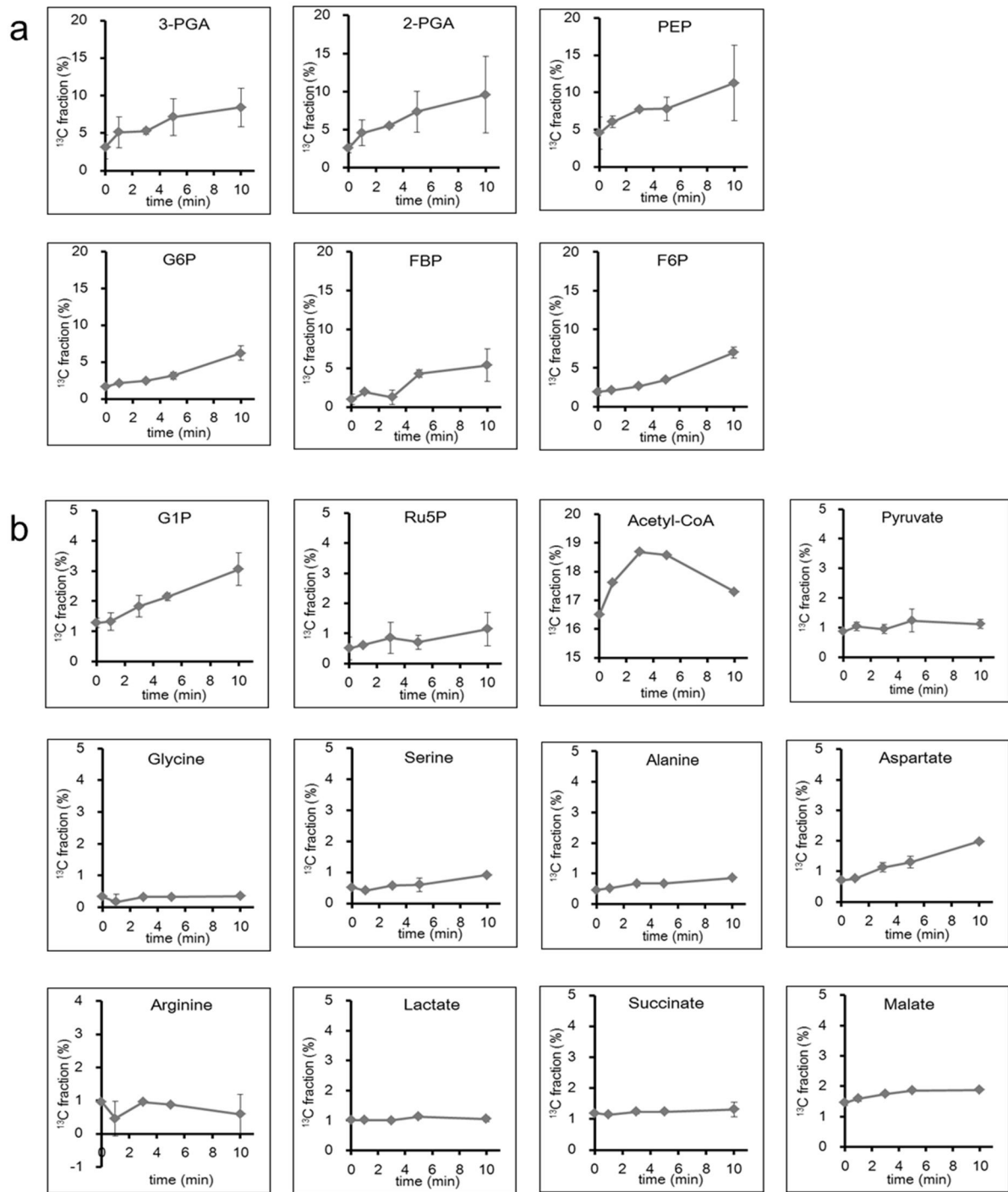


Fig. 4-7 *M. hungatei* における代謝産物の ^{13}C 代謝フラックスの解析

RHP 経路を含む、解糖系、糖新生の代謝物及びアミノ酸、計 18 種の ^{13}C 標識率の時間変化を解析した。縦軸は各代謝産物の総炭素あたりの ^{13}C 比率(%)を示す。(a) 標識率の増加が高い代謝物及び、(b) 標識率の増加が低い、全く変動がない代謝物をまとめている。これらの値は独立した 2 回の実験の平均値 \pm SD を示す。

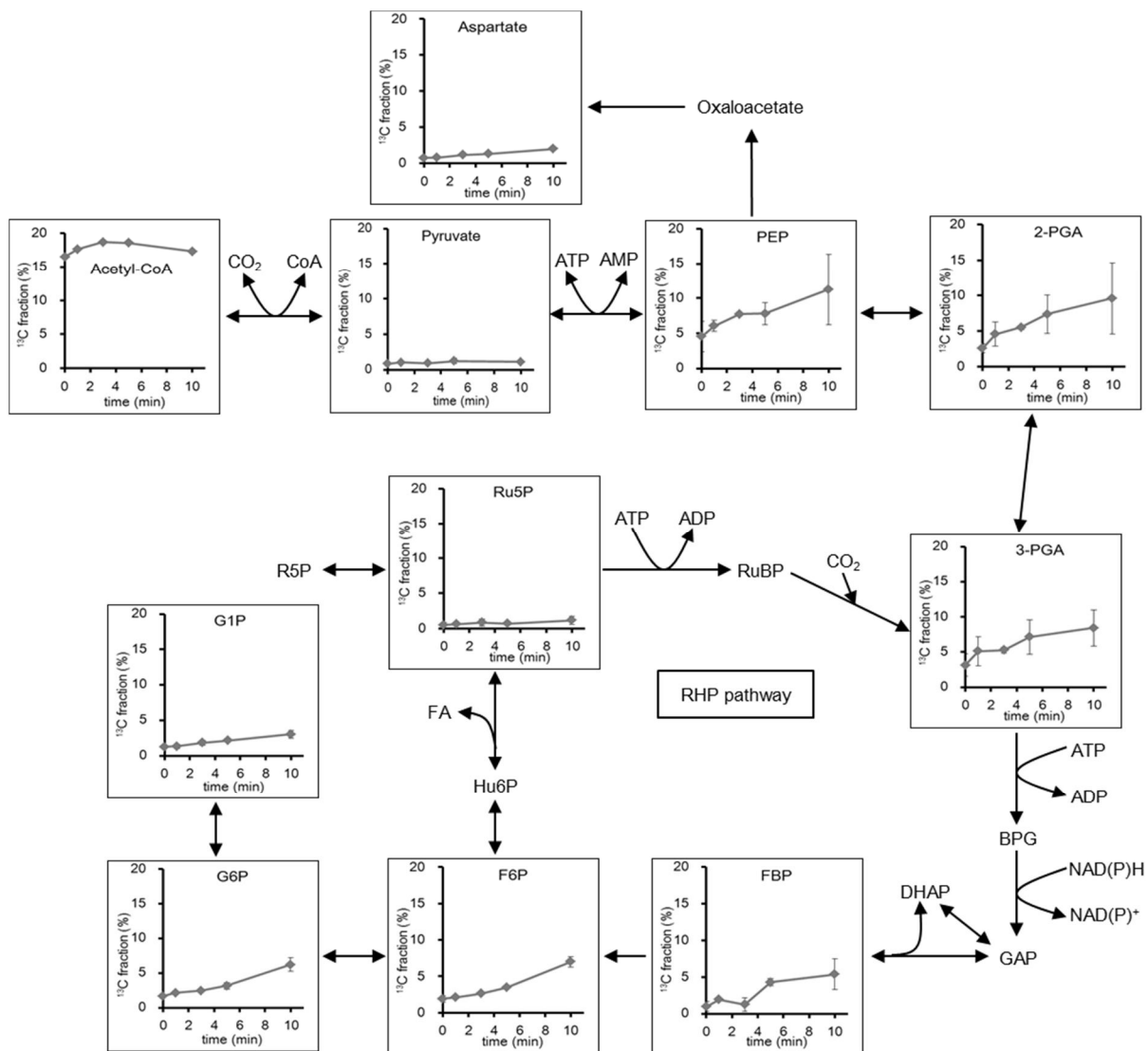


Fig. 4-8 *M. hungatei* における RHP 経路の ^{13}C 代謝フラックスの解析

Fig. 4-7 の結果より、RHP 経路の代謝産物及び、周辺経路の代謝産物の ^{13}C 標識率の時間経過による変動を代謝マップ形式にまとめた。

4-4. 考察

4-4-1. アーキア生体内における RHP 経路

本章ではこれまで大腸菌リコンビナントタンパク質を用いて解析してきた結果を、*M. hungatei* の菌体を用いて *in vivo* において検証した。*M. hungatei* 菌体素酵粗溶液を用いた実験から、RuBisCO、PRK 両酵素の活性が検出された。また、F6P から RuBisCO の CO₂ 固定反応産物である 3-PGA の生成が確認でき、RHP 経路で予想してきた F6P から 3-PGA への反応が進んでいることを確認した。RuBisCO の阻害剤である CABP を添加すると、F6P、RuBP どちらからも 3-PGA が生成されなかったことから、検出された 3-PGA は RuBisCO の carboxylase 反応由来であることも示された (Fig. 4-3 b)。更に *M. hungatei* 菌体粗酵素溶液のペプチド MS 解析を行ったところ、RuBisCO、Fae-HPS、HPS-MenG、PHI-a、PHI-b が同定された (Fig. 4-6)。今回の解析では PRK を同定できなかったが、これは発現量が少なかったために装置の検出限界を下回っていたか、他の発現量が多いタンパク質に隠れてしまい同定できなかった可能性が考えられる。

次に、メタボローム解析によって *in vivo* で RHP 経路が機能していることを明らかにした。リコンビナントタンパク質による活性値を考慮すると、目的代謝産物が極めて微量であると以前から予想していたが、メタボローム解析の結果から、やはり代謝物のプールサイズはカルビンサイクルを利用している光合成生物と比較して、非常に小さかった (Fig. 4-6)。メタン菌には RuBisCO 以外に恒常的に機能している 3 つの CO₂ 固定酵素 (FDH, Formylmethanofuran dehydrogenase; CODH/ACS, CO dehydrogenase/acetyl-CoA synthase; PFOR, Pyruvate ferredoxin oxidoreductase) が存在し、どの酵素によって優先的に CO₂ 固定が行われるのかは非常に興味深い問題であった。 [¹³C]CO₂ を用いて ¹³C 標識率の時間経過を解析したところ、reductive acetyl-CoA 経路で機能する PFOR 及び CODH/ACS による CO₂ 固定反応産物である pyruvate 及び acetyl-CoA における ¹³C 標識率の上昇度が 3-PGA と比べて著しく低く、acetyl-CoA から pyruvate 間での ¹³C 標識率の推移が見られなかったことから、CO₂ は RuBisCO によって優先的に固定されることが分かった (Fig. 4-8)。一方で、メタン生成経路で機能する FDH による CO₂ 固定反応は、標準物質が入手できないため検出できなかった。これまでの研

究から、FDHによって固定されたCO₂のほとんどはメタン生成に利用しているとされ、中央代謝系には入ってこないとされている (Ekiel et al., 1983)。さらに、3-PGAに引き続き、FBP, F6Pへの顕著な¹³C標識と、微量ながらRu5Pへの¹³C標識が確認できた (Fig. 4-7, 4-8)。これらの結果から *in vivo* でRHP経路が機能していることが明らかになった。

さらに解糖系及び糖新生の中間代謝産物にも¹³C標識が観察され、RuBisCOによって固定された炭素の大部分が、G6Pを経由して糖新生へ、PEPを経由して解糖系へ供給されていることが分かった。RHP経路にはRuBisCOが固定した炭素をformaldehydeとして放出する、HPSの反応ステップが含まれている。加えて前述のようにRu5Pの再生よりも解糖系・糖新生へと流れていることから、RHP経路はカルビンサイクルのように独立栄養生育を助けるものではなく、生体内でのRuBisCOが固定した炭素の各代謝への分配に寄与していることが考えられる。

一方、今回のメタボローム解析では、放出されるはずのformaldehydeの行方は解明できなかった。*Aciduliprofundum*を除いたRHP経路を有するアーキアでは、おそらくFaeによってmethylene-H₄MPTが合成される。前述のように、methylene-H₄MPTはメタン合成経路と還元的acetyl-CoA経路の中間代謝物である (Fig. 2-16)。Acetyl-CoAの¹³C標識率はわずかに増加しており (Fig. 4-7)、還元的acetyl-CoA経路に取り込まれたとするなら、放出されたformaldehydeからacetyl-CoA、そしてpyruvateへと¹³C標識の推移が見られるはずである。しかし今回の結果では、pyruvateの¹³C標識率に変化が見られず、acetyl-CoAが3-PGAへ変換されなかったことが示された (Fig. 4-8)。したがって、formaldehydeは還元的acetyl-CoA経路のacetyl-CoAに取り込まれ、その後、アーキアのイソプレノイド生合成経路であるメバロン酸経路 (Jain et al., 2014)を介して、脂質合成に利用されたことが考えられる。

4-4-2. アーキアにおける PRK の存在と進化的意義

本研究が報告されるまでアーキアにおける PRK の存在は報告されておらず、アーキアが有する RuBisCO は NMP 代謝経路でのみ働くものだと考えられていた。本研究は RuBisCO と PRK を同時に有するアーキアとして初めてのものであり、アーキアにおいて RuBisCO が PRK と共に新規炭素代謝経路で働いていることを明らかにした。現在でも RuBisCO、PRK 両方を持つアーキアの数はいくつかあるが、これらが PRK を獲得した利点は何なのだろうか。最大の変化は、Ru5P から 1 反応で RuBP を合成できる点である。NMP 代謝経路の初発反応である AMP から ribose-1,5-bisphosphate (RiBP) への反応を触媒する AMPase の平衡定数は 6.02×10^{-3} (Sato et al., 2007) と AMP 合成側に傾いており、NMP 代謝経路を介した RuBP 合成は非常に非効率的である。現在考えられているように、NMP 代謝経路はあくまで細胞内の余剰核酸、ペントースを中央代謝へ供給するものである。すると不可逆反応を触媒する PRK の獲得は、安定した RuBP の供給を可能にし、NMP 代謝経路から独立して RuBisCO が CO₂ 固定を行えると考えられる。つまり、炭素代謝に特化した経路への進化と言えるのではないだろうか。太古地球大気環境を考えても、炭素源として僅かに存在したと考えられる糖類や有機物を利用するより、豊富に存在する CO₂ を利用する方が、炭素源の競合相手が少なく済むことが容易に予想される。また、NMP 代謝経路を利用していると考えられ、かつ進化的にも始原生物に近いとされている好熱、超好熱菌 (特にユーリアーキオータ) の多くは従属栄養性である。対して PRK を持つアーキアは、調べた限りでは独立栄養性がほとんどであり、アーキアの中でも比較的後期に出現したことが予想されているメタン菌に集中しており (Allers and Mevarech, 2005; Gribaldo and Brochier-Armanet, 2006)、アーキアの進化における PRK の獲得は、アーキアが独立栄養性へと進むための重要な分岐点であったことが考えられる。

しかしながら前述のように、本研究ではアーキアにおける PRK、すなわち RHP 経路は炭素代謝には特化しているものの、独立栄養生育を支えているかどうかは明らかにすることはできなかった。アーキアが RuBisCO と PRK を獲得した後、さらに独立栄養生育を支えるための代謝経路を構築するためには、RHP 経路から炭素放出ステップを排除する必要がある (Fig. 2-16)。その可能性の 1 つとして、

transketolase/transaldolase の進化的獲得があったのではないかと考えている。現在までに分かっている RuBisCO, PRK 両遺伝子を有するアーキアの中で、*Aciduliprofundum* 属の 2 種のみ Fae 遺伝子を有しておらず (Table 3-4)、RHP 経路が働いた場合に放出される formaldehyde の行方が疑問だった。興味深いことに、*Aciduliprofundum* はそのゲノム上に transketolase、transaldolase 及び ribose-5-phosphate 3-epimerase (RPE) のホモログ遺伝子を有していた。もしこれらが機能した場合、還元炭素を formaldehyde として放出せずに F6P から Ru5P を合成することが可能になり、カルビンサイクルとほぼ一致することとなる (Fig. 4-9)。*Aciduliprofundum* が有する 3 つの酵素ホモログは他のアーキアには見られず、細菌が有する酵素とのみ相同性を示すことが分かった。これらのことから、RHP 経路を有したアーキアが、細胞融合や遺伝子水平伝播によって細菌から 3 酵素の遺伝子を引き継ぎ、RHP 経路をより炭素固定へと特化させたことが考えられる。次の第 5 章でも触れるが、その後、それぞれの酵素がカルビンサイクルで機能するためへと分子進化し、現在のカルビンサイクルが完成した。すなわち、生物進化上でも起源が古いとされるアーキアにおける RHP 経路が、カルビンサイクルの原型であると考えられる。

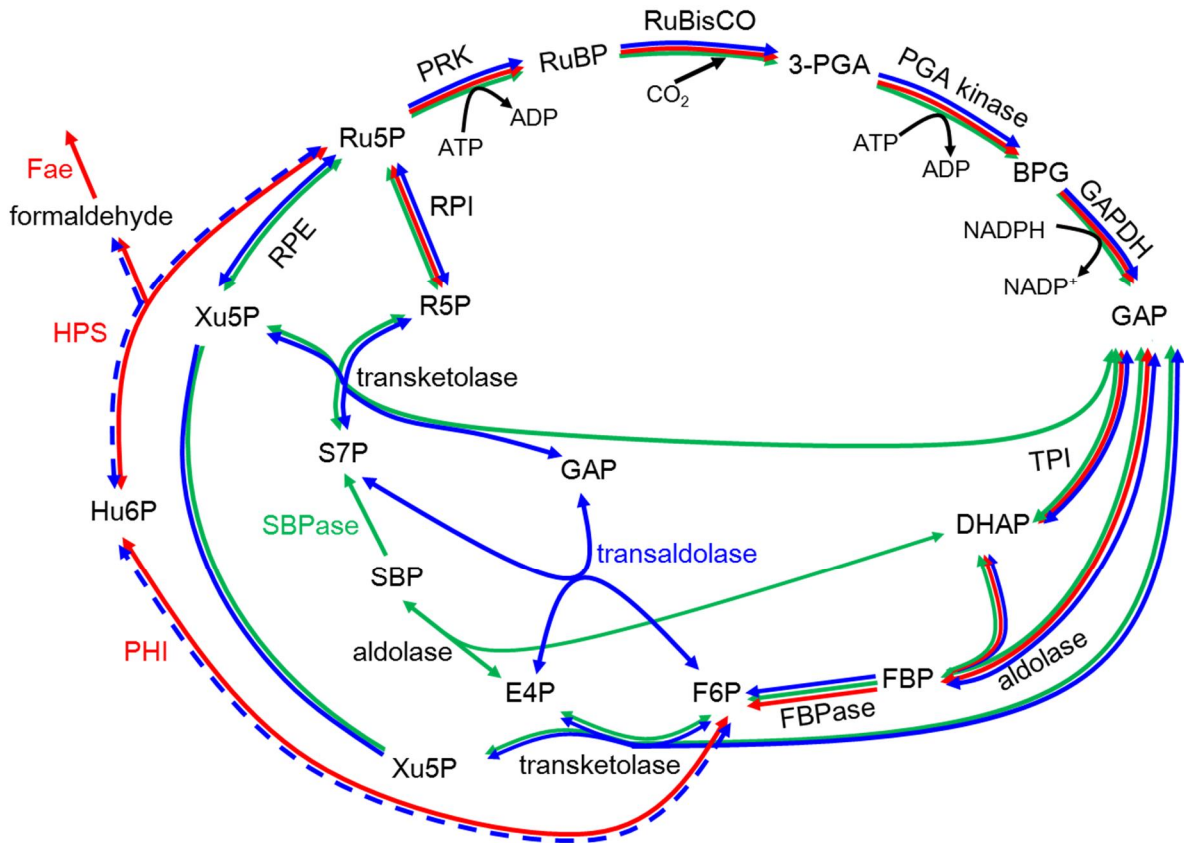


Fig. 4-9 カルビンサイクル、RHP 経路及び *Aciduliprofundum* において予想したカルビンサイクル様経路 (CBB-like cycle)

カルビンサイクルの反応ステップ及び特異的な酵素を緑、RHP 経路の反応ステップ及び特異的な酵素を赤、CBB-like cycle の反応ステップ及び特異的な酵素を青で示した。

Aciduliprofundum は Fae 遺伝子を有さないが、カルビンサイクル酵素である transketolase と RPE のホモログ遺伝子、ペントースリン酸経路酵素である transaldolase のホモログ遺伝子を有している。これら 3 酵素が機能すれば、RHP 経路の炭素放出ステップが排除され、カルビンサイクルとほぼ一致する炭素固定回路となる (青線)。

第 5 章 *Gloeobacter violaceus* の有する PRK ホモログの解析

5-1. 序論

第 2 章において、アーキア型 PRK の存在を明らかにした。*M. hungatei* PRK のアミノ酸配列を用いて、光合成生物の利用する PRK のデータベースに対して相同性検索及び、系統解析を行った結果、シアノバクテリア *Gloeobacter violaceus* が、PRK 系統樹においてアーキアのクレードに属するアーキア型 PRK と相同性を示す PRK ホモログ遺伝子を有していることが明らかになった。*G. violaceus* は 16S rRNA を用いた進化系統解析において、シアノバクテリアの中で特に起源が古い種と考えられており、本来光化学系の反応を行うチラコイド膜を持っていない (Nelissen et al, 1995; Fig. 5-1)。*G. violaceus* は 2003 年に全ゲノムが解読されている (Nakamura et al., 2003)。

私は *G. violaceus* のゲノム情報より、*G. violaceus* がアーキア型 PRK と相同性を示す *prk-3* (NP_925068)、典型的な植物型 PRK 遺伝子である *prk-1* (NP_925242)、機能未知の *prk-2* (NP_927370) の計 3 つの *prk* 相同遺伝子を有していることを見出した。PRK-1 に対して PRK-2 が 31%、PRK-3 が 28% であり、PRK-2 と PRK-3 は 26% の相同性を示した。一般的なシアノバクテリアが *prk-1* に対応する遺伝子しか有していないことから、*G. violaceus* における 3 つの PRK ホモログの存在は、PRK の分子進化を考える上で面白い研究材料である。PRK の系統樹において、*G. violaceus* PRK-3 はアーキア型 PRK と同じクレードに属している (Fig. 5-2)。このことから、アーキア型 PRK と酸素発生型光合成生物の関連性、カルビンサイクルの進化的完成メカニズムを明らかにできることを予想し、本章では *G. violaceus* が持つ 3 つの PRK に関して解析を行った。

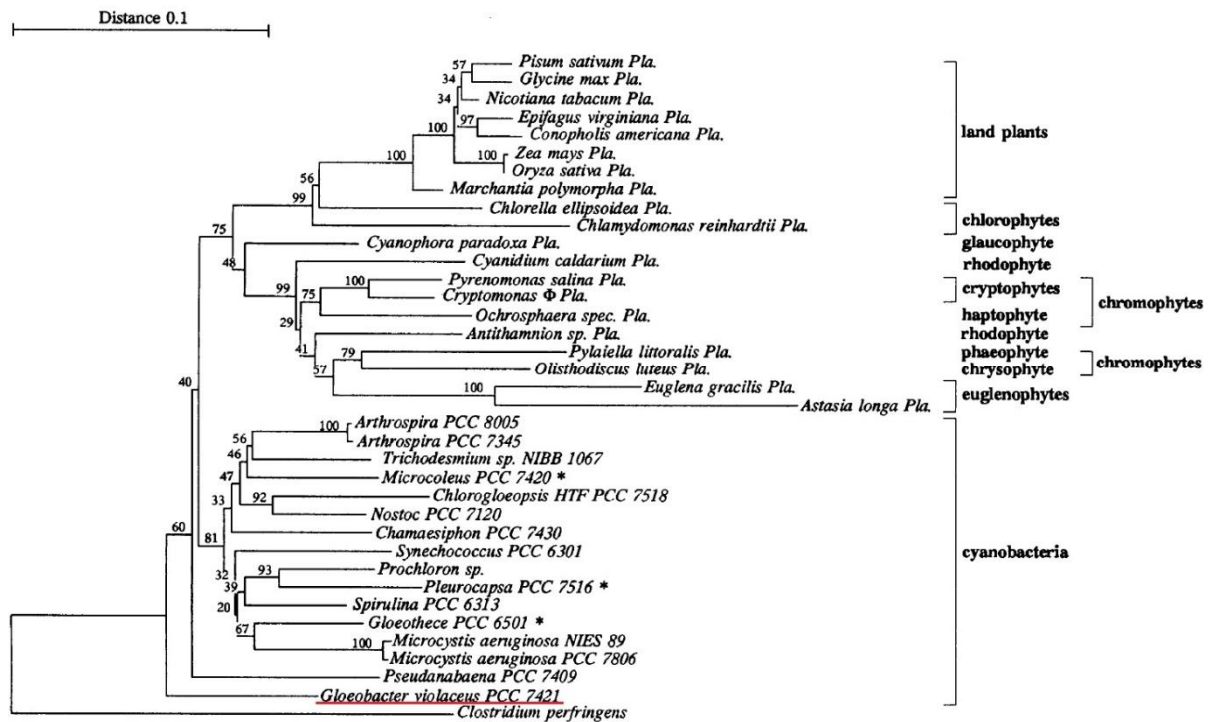


Fig. 5-1 16S rRNA による系統樹

(Nelissen et al., 1995)

Nelissen らが Jin と Nei (1990) の解析手法を元に作成したシアノバクテリア由来 16S rRNA 系統樹。ここで示す land plants ~ euglenophytes は、それぞれの plastids 由来 16S rRNA である。これにより、plastid の祖先だと考えられているシアノバクテリアの 16S rRNA とを比較している。その中でも赤下線で示す *G. violaceus* は、系統樹において最初に分岐しており、これまでに 16S rRNA 配列が分かっているシアノバクテリアの中でも特に原始的であると考えられている。

5-2. 材料と方法

5-2-1. His-tag を付加したリコンビナント PRK ホモログの発現系の構築

Gloeobacter violaceus PCC 7421 strain は、ATCC Global Bioresource center (USA)より入手した。*G. violaceus* は BG11 培地で、26°C, 20 $\mu\text{mol photons}$ の光照射下で培養した。以下のように、ゲノム DNA の抽出を行った。まず、菌体を蒸留水 600 μL に懸濁し、0.1 mm ジルコンビーズ 0.9 g を入れたエッペンチューブに移した。20,000 g, 4°C, 30 sec 遠心し、上清を除いた後に氷冷した TE buffer 300 μL , フェノール・クロロホルム(1:1) 300 μL を加えた。ボルテックスを 30 sec, 4 回行い、20,000 g, 4°C, 10 min 遠心操作を行った。得られた上清に、3 M CH_3COONa 1/10 volume, 100% EtOH 2 volume を加え、-20°C, 15 min 静置した後、20,000 g, 4°C, 10 min 遠心操作を行った。上清を捨て、70% EtOH 2 volume を加え、再度 20,000 g, 4°C, 10 min 遠心操作を行った。上清を捨て、dry up し、TE buffer に溶解したものを *G. violaceus* ゲノム DNA とした。

G. violaceus PRK の遺伝子配列情報は、KEGG より入手した。その情報をもとに、forward primer に *Nde*I、reverse primer に *Bam*HI サイトをそれぞれ付加したプライマーセットを作製した。

Primer name	Primer sequence (5'→3')
GVprk1-F	GAACCATATGGTCAGTACGTTGGACCGAGTGG
GVprk1-R	CGCGGATCCCTACTTGGCCTTGAAGCCG
GVprk2-F	GGCCATATGGCACAACGTCCGATCATTCTCGG
GVprk2-R	GGTCGCGGATCCCTAAACGTAGACGCCCCGCGAG
GVprk3-F	CGCCCATATGGAAACCCTTACCGCAACAGAGACG
GVprk3-R	TTAAGGGATCCCTATCGGTTTTTTTGAAGCAAAT

リコンビナントタンパク質発現株は、2-2-1 と同様の手法で作製した。

5-2-2. リコンビナントタンパク質の発現と精製

各リコンビナントタンパク質の発現及び精製は、2-2-2,-3 と同様の手法で行った。

5-2-3. PRK 活性測定法

PRK 活性は、2-2-4 と同様にして測定した。また、植物型 PRK と予想される *G. violaceus* PRK-1 に関してのみ、還元剤として測定系に終濃度 10 mM となるように DTT を加えた (Kobayashi et al., 2003)。

5-3. 結果

5-3-1. *G. violaceus* が有する 3 つの PRK ホモログの解析

はじめに、*G. violaceus* が持つ 3 つの PRK ホモログの中でも、一般的なシアノバクテリア PRK に相当する *G. violaceus* PRK-1 の PRK 活性測定を行った。その結果、 $V_{\max} = 206.2 \pm 12.3 \text{ } \mu\text{mol/min/mg protein}$, $K_{m(\text{Ru5P})} = 0.3 \pm 0.07 \text{ mM}$, $K_{m(\text{ATP})} = 91 \pm 2 \text{ } \mu\text{M}$ だった (Fig. 5-3; Table 5-1)。

次に、*G. violaceus* PRK-3 の PRK 活性測定を行ったところ、PRK 活性を示したが、Ru5P を基質とした際に $[S] \text{ } \delta v$ plot がミカエリスメンテンの式でフィットしない、シグモイド曲線を示した。そのため、Hill-plot ($v/(V_{\max} - v) : [S]$ での plot)より、その直線の傾きで Hill 係数: n を算出し、 V_{\max} 及び Ru5P に対する K_m 値は、Hill equation (1)により、算出した。

$$v = V_{\max} S^n / (S_{0.5}^n + S^n) \quad (1)$$

その結果、 $n = 1.63$ であり、 $n > 1$ であるため、*G. violaceus* PRK-3 は正の協同性を示すアロステリック酵素であることが示唆された (Fig. 5-4 a)。また、 $V_{\max} = 23.9 \pm 0.55 \text{ } \mu\text{mol/min/mg protein}$, $K_{m(\text{Ru5P } 0.5)} = 4.98 \pm 0.14 \text{ mM}$ だった (Fig. 5-4; Table 5-1)。 $K_{m(\text{ATP})}$ に関しては、非常に多量の Ru5P が必要となるため、測定は行わなかった。

一方、*G. violaceus* PRK-2 は PRK 活性を示さなかった (Table 5-1)。

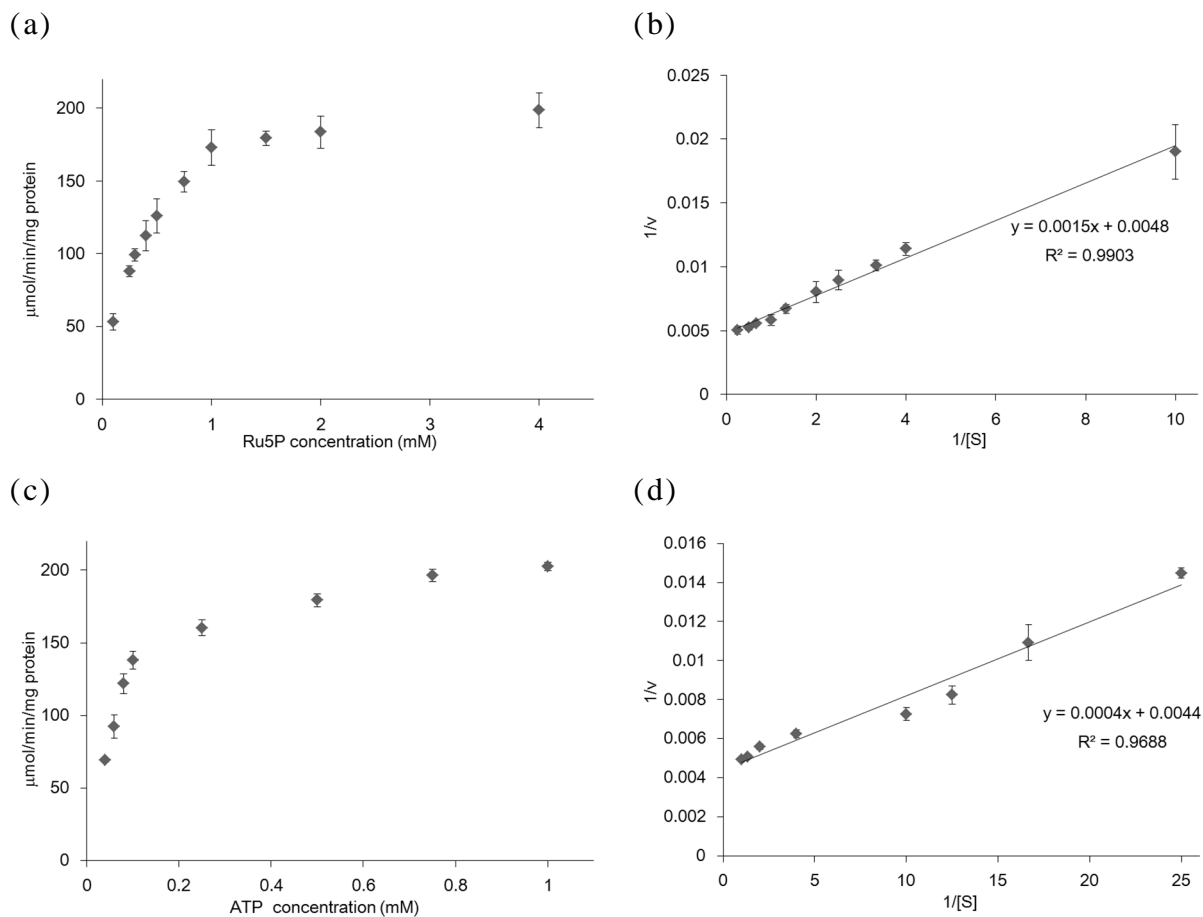


Fig. 5-3 *G. violaceus* PRK-1 の酵素学的パラメータの解析

G. violaceus PRK-1 の酵素学的パラメータを決定するために、酵素学的解析を行った。

基質である(a) Ru5P、または(c) ATP の各濃度における反応速度をプロットした。それぞれの値は独立した3回の実験の平均値 \pm SDを示す。(b) Ru5P、(d) ATP に対する V_{\max} 、 K_m 値は、Lineweaver-Burk の逆数プロットにより、算出した。

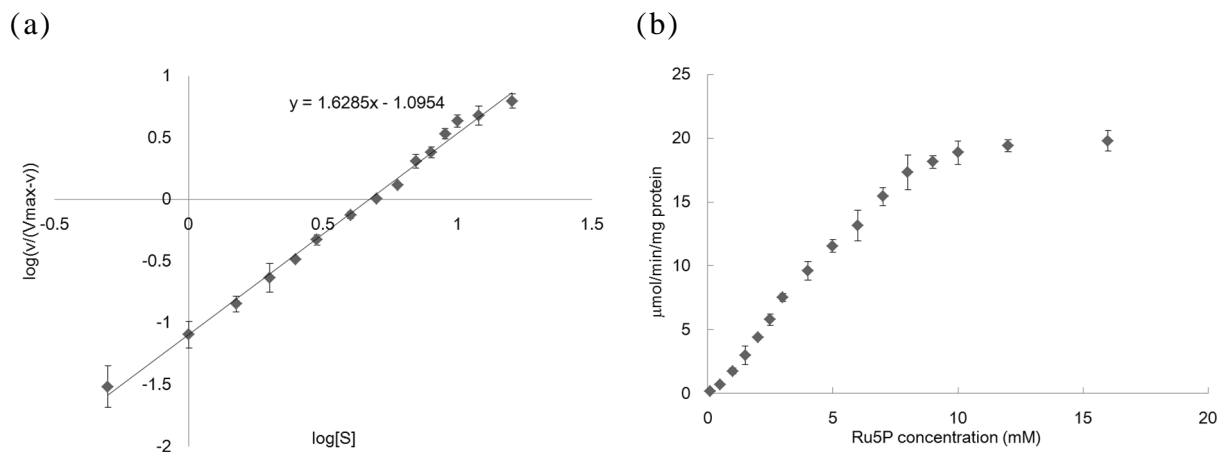


Fig. 5-4 *G. violaceus* PRK-3 の酵素学的パラメータの解析

G. violaceus PRK-3 の酵素学的パラメータを決定するために、酵素学的解析を行った。

(a) 基質 Ru5P の逆数に対する Hill プロット及び、(b) 基質である Ru5P の各濃度における反応速度をプロットした。それぞれの値は独立した 3 回の実験の平均値 \pm SD を示す。*G. violaceus* PRK-3 はミカエリスメンテンの式にフィットしないシグモイド曲線を示したため、 V_{max} 及び Ru5P に対する K_m 値は Hill equation により、算出した。

Table 5-1 GvPRKs の酵素学的パラメータと他生物 PRK との比較

Species	V_{\max} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	K_m (Ru5P) (mM)	K_m (ATP) (μM)
<i>G. violaceus</i> PRK-1	206.2 \pm 12.3	0.3 \pm 0.07	91 \pm 2
<i>G. violaceus</i> PRK-2	N.D.	N.D.	N.D.
<i>G. violaceus</i> PRK-3	23.9 \pm 0.55	4.98 \pm 0.14 ($S_{1/2\text{Ru5P}}$)	N.T.
<i>M. hungatei</i> (Archaeon)	29.3 \pm 1.7	0.28 \pm 0.05	12 \pm 0.4
<i>S. oleracea</i> (Plant)	410 ^{*1}	0.22 ^{*1}	62 ^{*1}
<i>S. elongatus</i> PCC 7942 (Cyanobacterium)	230 ^{*2}	0.27 ^{*2}	90 ^{*2}
<i>R. sphaeroides</i> (Bacterium)	338 ^{*3}	0.10 ^{*3}	550 ($S_{1/2\text{ATP}}$) ^{*3}

全てのデータは 25°C で測定された。

*¹: Reference Data from Porter et al., 1986

*²: Reference Data from Kobayashi et al., 2003

*³: Reference Data from Runquist and Mizioroko, 2006

G. violaceus PRK の酵素学的パラメータの値は、全て独立した 3 回の実験の平均値 \pm SD を示す。

N.D.: Not detected

N.T.: Not tested

5-4. 考察

5-4-1. *G. violaceus* は 2 つの機能的な PRK を有する

シアノバクテリアは、地球上で初めて酸素発生型光合成を行った生物だとされ、高等植物や緑藻の葉緑体の起源であると考えられている (Giovannoni et al., 1988)。また、Gupta らの行った様々な共通遺伝子の高度保存領域における indel (insert と deletion) に注目した原核生物の進化解析から、カルビンサイクルはシアノバクテリアで完成したことが示唆されている (Gupta, 2003)。しかし、その完成への進化的な過程は、未だ不明である。

シアノバクテリアの中でも、*G. violaceus* は特にその起源が古いと考えられている。*G. violaceus* は光合成明反応を行う場であるチラコイド膜を有さず、その細胞膜上に光化学系システムを持ち、明反応を行っている。そのため、光化学系の起源を解明するための研究材料として注目されている (Mangels et al., 2002)。

本章では、この *G. violaceus* のゲノム上にコードされている 3 つの PRK ホモログに着目し、実験を行った。その結果、*G. violaceus* PRK-1 は通常シアノバクテリアがカルビンサイクルで利用している PRK とほぼ同じ kinetics parameter を示した。このことと配列相同性から、*G. violaceus* PRK-1 は酸素発生型光合成生物の利用する PRK であり、*G. violaceus* の生体内でも、カルビンサイクルで働いていることが予想される。加えて、アーキア型 PRK である *G. violaceus* PRK-3 も PRK 活性を有していた。しかし、基質 Ru5P に対する親和性は *G. violaceus* PRK-1 の約 1/15 と低く、 V_{max} も 2 章で明らかにした *M. hungatei* PRK と同程度ではあるものの、*G. violaceus* PRK-1 の 1/10 程度だった。そのため *G. violaceus* の生体内においては、PRK-1 が主要な PRK としてカルビンサイクルで機能していることが予想される。

一方で PRK 活性を示さなかった *G. violaceus* PRK-2 は、PRK の系統樹において一部の *Nostoc* 属や *Anabaena* 属といった糸状性シアノバクテリアが有する PRK ホモログと同じクレードに属している (Fig. 5-2)。*G. violaceus* PRK-2 を含むこのクレードの PRK ホモログは、*S. elongates* PCC7942 PRK の結晶構造解析で解明された酸素発生型光合成 PRK の必須残基を全て有しており、PRK としての機能を有する条件は揃っている (Matsumura et al., unpublished)。このことから *G. violaceus* PRK-2 が PRK

の触媒能を示さなかったのは、不明な点が多い。今後、同じクレードの *Nostoc* や *Anabaena* の有する PRK を解析することで、*G. violaceus* PRK-2 の真の機能解明に繋がるのではないかと考えている。

5-4-2. 近年のゲノム解読から見た PRK の分布と分類

ここ数年のゲノム解読からアーキアや *G. violaceus* 以外でもアーキア型 PRK ホモログ遺伝子を有する生物種が存在することが明らかになってきた (Fig. 5-2)。 *Arhodomonas aquaeolei* (Adkins et al., 1993) と *Spiribacter salinus* (León et al., 2013, 2014) は共に好気好塩菌であり、アーキアでないにも関わらず、アーキア型 PRK ホモログ遺伝子を有している。一方でどちらも RuBisCO 遺伝子は有していないが、*A. aquaeolei* は RuBisCO-like protein (RLP) ホモログ遺伝子を有している。これまでの RuBisCO と RLP 研究の知見及び、RuBisCO の触媒必須残基、19 アミノ酸残基が完全には保存されていないことから、これら RLP が RuBisCO としての機能を有しているとは考えられない (Ashida et al., 2005; Saito et al., 2009)。 *Bacillus subtilis* において RLP は methionine salvage pathway で働くことが報告されているが、methionine salvage pathway を持たない種も多く、それらの RLP に関する機能は不明である (Ashida et al., 2003)。 *A. aquaeolei*、*S. salinus* はゲノム情報上では methionine salvage pathway を持っていないが、完全なペントースリン酸経路を持っていることが予想されている。そのため、これらの PRK ホモログがカルビンサイクルとも RHP 経路とも異なる、新たな代謝経路で機能していることが考えられ、その機能解明に興味を持たれる。

また、糸状性シアノバクテリア *Oscillatoria* 種の中でも *Oscillatoria* sp. PCC10802 は、アーキア型 PRK と植物型 PRK の 2 つの PRK を有することが分かった (Fig. 5-2)。この種は 16S rRNA 系統解析からシアノバクテリアの中でも比較的新しい種であることが予想され (Shih et al., 2013)、なぜ最も始原的なシアノバクテリアである *G. violaceus* と、進化的に新しいシアノバクテリアである *Oscillatoria* sp. PCC10802 の 2 種がアーキア型 PRK 遺伝子を有しているのかは、非常に興味深い。*G. violaceus* PRK-3 は 2 章で明らかにしたアーキアが有するアーキア型 PRK とは異なり、Ru5P への親和性が低いという酵素特性を示した (Table 5-1)。これが *G. violaceus* PRK-3 特有のものなのか、*Oscillatoria*

sp. PCC10802 や *A. aquaeolei*、*S. salinus* が有するアーキア型 PRK ホモログにも共通する特性なのか、生体内でのアーキア型 PRK の役割解明も含め、今後の解析が待たれる。

5-4-3. PRK の分子進化モデル

本章の実験より、*G. violaceus* の有するアーキア型 PRK、*G. violaceus* PRK-3 が PRK 活性を有することが明らかになった。これは、アーキアから水平伝播などで *G. violaceus* にアーキア型 PRK 遺伝子が受け継がれた可能性を示唆している。しかし、*G. violaceus* PRK-3 の kinetics parameter は、光合成カルビンサイクルで機能するには不利な点が多い。*M. hungatei* PRK を始めとしたアーキア型 PRK の Ru5P に対する親和性に比べ、*G. violaceus* PRK-3 は 1/20 程度である。このことから、アーキア由来だと予想される *G. violaceus* PRK-3 は、*G. violaceus* に受け継がれる過程、もしくはその後に変異などが入った可能性が考えられる。

アーキア型 PRK の活性制御メカニズムは不明だが、植物型 PRK は分子内システイン残基への修飾やジスルフィド結合により、活性制御を受けている (Wolosiuk and Buchanan, 1978; Kobayashi et al., 2003; Graciet et al., 2004)。アーキア型 PRK はこれに該当するシステイン残基は保存されておらず、2章の結果から既知の光合成 PRK レギュレータの影響を受けない (Fig. 2-7)。*G. violaceus* PRK-3 にはこの2つのシステインの内、1つが保存されており、もう一方はアーキア型に共通してセリン残基である。このことから、アーキア型から植物型に進化する過程で、活性制御のためのシステイン残基に置き換わったことが予想される。

また、2013年にゲノム解読が終了した *Gloeobacter kilaueensis* は *G. violaceus* の近縁種であり、両者間での 16S rRNA の相同性が 98.65% と非常に高く、*G. violaceus* と同様に原始的なシアノバクテリアであると考えられる (Saw et al., 2013)。それにも関わらず、*G. kilaueensis* は *G. violaceus* における PRK-3 に該当する遺伝子ホモログは有しておらず、PRK-1 及び PRK-2 に該当する2つの PRK ホモログ遺伝子のみを有していた。この *G. kilaueensis* と *Oscillatoria* sp. PCC10802 の存在は、シアノバクテリアにおけるアーキア型 PRK の獲得または欠失という論点は、より複雑かつ興味深い。

現在考えている PRK の分子進化モデルは、RHP 経路で機能するアーキア型 PRK を起源とし、カルビンサイクルで機能する光合成 PRK へと進化するものである。まずアーキア型 RuBisCO が機能する NMP 経路へ、アーキア型 PRK が獲得されることで、RHP 経路が誕生した。2 章で明らかにした *M. hungatei* PRK の立体構造から、この段階のアーキア型 PRK で、すでに光合成 PRK としての骨格、二次構造がほぼ形成されたことが考えられた。

前章 4-4-2 でも述べたように、その後、酸化型ペントースリン酸経路や光合成システムを持つ他生物との遺伝子水平伝播によって、カルビンサイクルを構成する 11 酵素が揃い、Gupta (2003) の主張のようにシアノバクテリアでカルビンサイクルが完成したと考えられる。その後、遺伝子重複による変化で、活性部位や活性制御に関わる Cys 残基などのマイナーなアミノ酸置換が起き、それに起因する構造変化で光合成 PRK へと最適化し、分子進化した。つまり、アーキア型 PRK が光合成 PRK の進化的起源であるという、PRK 分子進化仮説と、カルビンサイクルの進化的完成仮説が考えられる。

本研究から得られた結果では、これらの仮説を証明するには不十分である。今後の *Aciduliprofundum* の CBB-like cycle や、*G. kilaueensis*, *Oscillatoria* sp. PCC10802 といった PRK を複数持つシアノバクテリアの解析、*A. aquaeolei* や *S. salinus* といった好塩菌の持つ PRK の解析に期待が持たれる。また、*Gloeobacter* 種よりさらに祖先的なシアノバクテリア、もしくはバクテリアやアーキアが発見されれば、PRK の進化的伝播、さらにカルビンサイクルの進化的完成過程を明らかにするためへの大きな一歩となるだろう。

第 6 章 総括

現代の地球では、陸上や海中に存在する光合成生物が利用するカルビンサイクルによって CO_2 が固定され、年間 1,400 億トンものバイオマスに変換、貯蓄されている。また、これら光合成由来のバイオマスは嫌気的環境下でバクテリアによって CH_3COOH と CO_2 に分解され、更にメタン菌の利用するメタン代謝によって年間 10 億トンもの **methane** へと生物的に変換されている。このことから、これら 2 つの代謝経路が地球上のカーボンサイクルの中心を担っていると言えるだろう (Thauer, 2011)。 CO_2 と **methane** は温室効果作用が強く、現代社会では温室効果ガスとして問題視されているが、これまでの地球史上、氷河期から回復したのはこれらの温室効果の恩恵だとも言われている (Kennedy et al., 2008)。また近年では、**methane** を代替エネルギーとして利用する動きが活発であり、生ごみとメタン菌によるバイオガス供給事業や、2013 年には世界で初めてメタンハイドレートから **methane** の採取に成功するなど、日本国内で採取、利用できる資源として研究開発が進んでいる。一方で CO_2 削減への最も直接的な手法として、植物や藻類を中心とした光合成能力の研究も盛んに行われており、特に CO_2 固定酵素である RuBisCO に関しては、今日まで長年研究されてきた。

本研究はカルビンサイクルの進化的完成の解明という大きな枠組みの中でも、カルビンサイクルの鍵酵素である RuBisCO と PRK を中心とした解析を行い、進化的にも古く非光合成生物であるアーキアにその起源・原点を見出した。

本研究の成果として、第 2 章では非光合成生物であるメタン菌 *M. hungatei* が機能的な RuBisCO と PRK を有し、*M. hungatei* 以外の 4 種のアーキアも機能的な PRK を有していることを明らかにした。特に *M. hungatei* PRK の結晶構造解析から、植物型 PRK と類似性が高く、進化的関連性が示唆された。またこれらの結果からアーキアがカルビンサイクルを持つことが期待されたが、これらのアーキアは共通して 3 つのカルビンサイクル酵素遺伝子を有していなかった。しかし、ゲノム情報から RuMP 経路の鍵酵素である、HPS、PHI ホモログ遺伝子をそのゲノム上にコードしており、これらを利用して欠けた反応ステップを

補完していた。これらの事から、RuBisCO と PRK を有するアーキアにおいて、RuBisCO と PRK、HPS と PHI を利用した、カルビンサイクル様新規炭素代謝経路、RHP 経路の存在を明らかにした。

次に第 3 章では、補完していると予想した HPS、PHI の反応を、*M. hungatei* HPS、PHI ホモログタンパク質を用いて検証した。その結果、これらの酵素は F6P から Ru5P までの反応を触媒し、欠けたステップを補完できることを明らかにした。これまでの結果と併せて、RHP 経路において key point となる F6P から 3-PGA までの反応を、*M. hungatei* 由来の 5 種類の酵素によって、*in vitro* において再現することに成功した。

更に第 4 章では、*M. hungatei* の菌体を用いて、生体内で RuBisCO、PRK が機能的なタンパク質として存在しているのか、RHP 経路は機能しているのかを検証した。結果として、RuBisCO、PRK 両酵素の活性を検出し、F6P を基質として最終的に RuBisCO 反応由来の 3-PGA を生成することを明らかにした。加えて、¹³C 標識によるメタボローム解析によって、*M. hungatei* 生体内で RHP 経路が機能していることを明らかにし、RHP 経路は RuBisCO によって固定した炭素を解糖系・糖新生へと流し、生体内での炭素分配に寄与していることが示唆された。同様に他の RuBisCO と PRK を有するアーキアにおいても RHP 経路が働いていることが予想される。

また第 5 章では、葉緑体の起源であるシアノバクテリア中でも特に原始的だと言われている *G. violaceus* が、機能的なアーキア型 PRK と植物型 PRK を同時に有していることを明らかにした。

本研究で提唱した RHP 経路とカルビンサイクルでは、F6P から Ru5P までのわずか 3 ステップのみが異なっている。そのため、RHP 経路を起源として、進化的に残りの酵素を獲得した結果、カルビンサイクルの完成に至ったのではないかと予想している。この仮説を裏付けるのが、好熱好酸性アーキア *Aciduliprofundum* において予想した CBB-like cycle であり、カルビンサイクルとは 1 ステップが違うのみである。これらのことから、RHP 経路を有するアーキアが水平伝播によって欠けていた酵素遺伝子を獲得し、原始シアノバクテリアにおいて完全なカルビンサイクルが完成したという、カルビンサイクルの進化的完成仮説を提案した。さらにその過程で、アーキア型 PRK を進化的起源とし、

光合成 PRK へと進化したという、新たな PRK 分子進化の仮説を提案した。

本研究によって、カルビンサイクルの進化的原型をアーキアに見出し、光合成システムの基盤がアーキアで構築されていたことを明らかにした。本研究から得られた結果は、地球上のカーボンサイクルの中心を担う代謝経路の起源に触れるものであり、原始地球から現在までの大気環境の歴史と、アーキアからの光合成生物進化を議論するうえで、重要な知見になることが期待される。

謝辞

本学に入学してから6年間、その後の学位取得までの2年間、本当に数多くの方に支えられながら、研究生活を送ることができました。

植物代謝制御学研究室 出村拓 教授には、修士時代のアドバイザーから、最後は学位取得の主査を請け負っていただけたことを大変感謝いたします。

分化・形態形成学研究室 横田明穂 教授 (現 名誉教授)には5年間にわたり、主指導教員として、そして今日に至るまで日々ご指導、助言をいただいたことを感謝いたします。

同講座、蘆田弘樹 助教 (現 神戸大学人間発達環境学研究科 准教授)には、本研究テーマを任せていただいたこと、日頃の実験、深夜のディスカッション、投稿論文完成までの長い道のりなど、感謝しきれないほどのご指導をいただきました。また研究者として、人として、数多くのことを学ばせていただきました。修士1年から神戸大学での研究員生活を含めて計8年間、本当にお世話になりました。

13年度卒業の遠藤千夏子氏は普段から熱心に実験を行い、本研究を進めるにあたり、重要なデータを出してくれました。私の精神安定剤でもあった遠藤には、大変感謝しています。

また同講座スタッフの方々には、日頃からストレス発散のお菓子作りに付き合っただき、大変お世話になりました。

大阪大学 松村浩由 准教授 (現 立命館大学生命科学部 教授)、2013年卒業 木津奈都子さんには、共同研究として *M. hungatei* PRK の結晶構造を明らかにし、構造から見たアーキア型 PRK の助言をいただきました。本研究がここまで大きなストーリーに成長したのは、松村先生との共同研究によるものが多いと思います。

静岡大学 木村浩之 准教授には、*M. hungatei* の培養に協力していただき、ずっと探していた本研究の要ともいえる結果を導き出すに至りました。また、メタン菌の専門家から見た実験に関するアドバイス

や、培養技術の指導などの助言も非常に参考になりました。運命的な出会いだと思っています。

京都大学 阪井康能 教授、由里本博也 准教授には、*M. gastri* HPS, PHI 発現株を譲渡していただき、*M. hungatei* HPS, PHI の解析を進めるにあたり、大きなブレイクスルーになりました。

NAIST、大阪大学 大木出 助教には、NMR 解析による *M. hungatei* HPS, PHI の反応生成物同定を試みた際、大変お世話になりました。

NAIST 深尾 陽一朗 特任准教授、技術職員 倉田理恵様には、反応産物の同定やペプチド MS といった、本研究の裏付けとなる重要なデータを数多く取っていただきました。

神戸大学 蓮沼 誠久 教授、研究員 松田真実様には、共同研究として *M. hungatei* のメタボローム解析を行っていただき、本研究の最後の 1 ピースともいえる結果を導き出すに至りました。投稿論文の受理に辿り着けたのは、このデータあってこそでした。

神戸大学大学院人間発達環境学研究科 光合成機能研究室の学生たちには、日頃から実験の補助や娘の遊び相手、そして楽しい 2 年間で共に過ごせたことを感謝しています。

在学中、毎週末テニスができ、研究に行き詰った際に心の支えとなったテニスサークル Festy には大変感謝しています。

また、高山テニスサークルの方々には、親子ともども非常に可愛がっていただき、テニスだけでなく人生に関するアドバイスも多くいただけたことを感謝しています。

最後に、計 12 年にも渡る大学生生活を支援してくれた両親、私の成功を信じていてくれた両祖父母には、心から感謝いたします。

妻 愛子には最大限の感謝の気持ちを込めて。

この場を借りて、本研究に関わっていただいた皆様に感謝の意を表します。

参考文献

Abdelal, A. T., and Schlegel, H. G. (1974) Purification and regulatory properties of phosphoribulokinase from *Hydrogenomonas eutropha* H 16. *Biochem. J.* **139**, 481-489.

Adkins, J., Madigan, M. T., Mandelco, L., Woese, C. R., Tanner, R. S. (1993) *Arhodomonas aquaeolei* gen. nov., sp. nov., an aerobic, halophilic bacterium isolated from a subterranean brine. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**, 514-520.

Akutsu, J., Zhang, Z., Morita, R., and Kawarabayasi, Y. (2015) Identification and characterization of a thermostable bifunctional enzyme with phosphomannose isomerase and sugar-1-phosphate nucleotidyltransferase activities from a hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus horikoshii* OT3., *Extremophiles.* **19**, 1077-1085.

Allers, T., and Mevarech, M. (2005) Archaeal genetics - the third way. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 58-73.

Alonso, H., Blayney, M. J., Beck, J. L., and Whitney, S. M. (2009) Substrate-induced assembly of *Methanococcoides burtonii* D-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase dimers into decamers. *J. Biol Chem.* **284**, 33876-33882.

Aono, R., Sato, T., Yano, A., Yoshida, S., Nishitani, Y., Miki, K., Imanaka, T., and Atomi, H. (2012) Enzymatic characterization of AMP phosphorylase and ribose-1,5-bisphosphate isomerase functioning in an archaeal AMP metabolic pathway. *J. Bacteriol.* **194**, 6847-6855.

Aono, R., Sato, T., Imanaka, T. and Atomi, H. (2015) A pentose bisphosphate pathway for nucleoside degradation in Archaea. *Nat. Chem. Biol.* **11**, 355-360.

Arfman, N., Bystrykh, L., Govorukhina, N. I., and Dijkhuizen, L. (1990) 3-Hexulose-6-phosphate synthase from thermotolerant methylotroph *Bacillus C1*. *Meth. Enzymol.* **188**, 391-397.

Ashida, H., Danchin, A., Yokota, A. (2005) Was photosynthetic RuBisCO recruited by acquisitive evolution from RuBisCO-like proteins involved in sulfur metabolism? *Res. Microbiol.* **156**, 611-618.

Ashida, H., Saito, Y., Kojima, C., Kobayashi, K., Ogasawara, N., and Yokota, A. (2003) A functional link between RuBisCO-like protein of *Bacillus* and photosynthetic RuBisCO. *Science* **302**, 286-290.

Baker, B. J., and Banfield, J. F. (2003) Microbial communities in acid mine drainage. *FEMS Microbiol. Ecol.* **44**, 139-152.

Bassham, J. A., Benson, A. A., and Calvin, M. (1950) The path of carbon in photosynthesis. *J. Biol. Chem.* **185**, 781-787.

Berg, I. A., Kockelkorn, D., Ramos-Vera, W. H., Say, R. F., Zarzycki, J., Hugler, M., Alber, B. E., and Fuchs, G. (2010) Autotrophic carbon fixation in archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 447-460.

Blankenship, R. E., and Hartman, M. (1998) The origin and evolution of oxygenic photosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 94-97.

Bult, C. J. and Venter J. C., et al., (1996) Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* **273**, 1058-1073.

Daugherty, M., Vonstein, V., Overbeek, R., and Osterman, A. (2001) Archaeal shikimate kinase, a new member of the GHMP-kinase family. *J. Bacteriol.* **183**, 292-300.

Deppenmeier, D., Müller, V., and Gottschalk G. (1996) Pathways of energy conservation in methanogenic archaea. *Arch. Microbiol.* **165**, 149-163.

Ekiel, I., Smith, I. C., and Sprott, G. D. (1983) Biosynthetic pathways in *Methanospirillum hungatei* as determined by ^{13}C nuclear magnetic resonance. *J. Bacteriol.* **156**, 316-326.

Ezaki, S., Maeda, N., Kishimoto, T., Atomi, H., and Imanaka, T. (1999) Presence of a Structurally Novel Type Ribulose-bisphosphate Carboxylase/Oxygenase in the Hyperthermophilic Archaeon, *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1. *J. Biol. Chem.* **274**, 5078-5082.

Finn, M. W., and Tabita, F. R. (2003) Synthesis of Catalytically Active Form III Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase in Archaea. *J. Bacteriol.* **185**, 3049-3059.

Finn, M. W., and Tabita, F. R. (2004) Modified pathway to synthesize ribulose 1,5-bisphosphate in methanogenic archaea. *J. Bacteriol.* **186**, 6360-6366.

Fish, L., Kuck, U., and Bogorad, L. (1985) Two partially homologous adjacent light-inducible maize chloroplast genes encoding polypeptides of the P700 chlorophyll a-protein complex of photosystem I. *J. Bacteriol.* **260**, 1413-1421.

Francis, C. A., Beman, J. M., and Kuypers, M. M. (2007) New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *ISME J.* **1**, 19-27.

Franzmann, P., Liu, Y., Balkwill, D. L., Aldrich, H. C., Conway de Macario, E., and Boone, D. R. (1997) *Methanogenium frigidum* sp. nov., a psychrophilic, H_2 -using methanogen from Ace Lake, Antarctica. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 1068-1072.

Geck, M. K. and Hartman, F. C. (2000) Kinetic and mutational analyses of the regulation of phosphoribulokinase by thioredoxins. *J. Biol. Chem.* **275**, 18034-18039.

Giovannoni, S., Turner, S., Olsen, G. J., Barns, S., Lane, D. J., and Pace, N.R. (1988) Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *J. Bacteriol.* **170**, 3584-3592.

Glikson, A.Y. (1972) Early Precambrian evidence of a primitive ocean crust and island nuclei of sodic granite. *Geol. Soc. Am. Bull.* **83**, 3323-3344.

Goenrich, M., Thauer, R. K., Yurimoto, H., and Kato, N. (2005) Formaldehyde activating enzyme (Fae) and hexulose-6-phosphate synthase (Hps) in *Methanosarcina barkeri*: a possible function in ribose-5-phosphate biosynthesis. *Arch. Microbiol.* **184**, 41-48.

Graciet, E., Lebreton, S., and Gontero, B. (2004) Emergence of new regulatory mechanisms in the Benson-Calvin pathway via protein-protein interactions: a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/CP12 /phosphoribulokinase complex. *J. Exp. Bot.* **55**, 1245-1254.

Gribaldo, S., and Brochier-Armanet, C. (2006) The origin and evolution of Archaea: a state of the art. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Bio. Sci.* **361**, 1007-1022.

Gubernator, B., Bartoszewski, R., Kroliczewski, J., Wildner, G., and Szczepaniak, A. (2008) Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus*. *Photosynth. Res.* **95**, 101-109.

Gunsalus, R. P., and McInerney, M. J., et al., (2016) Complete genome sequence of *Methanospirillum hungatei* type strain JF1. *Stand. Genomic. Sci.* **11**, 2.

Gupta, R. (2003) Evolutionary relationships among photosynthetic bacteria. *Photosynth. Res.* **76**, 173-183.

Harrison, D. H., Runquist, J. A., Holub, A., and Mizioro, H. M. (1998) The crystal structure of phosphoribulokinase from *Rhodobacter sphaeroides* reveals a fold similar to that of adenylate kinase. *Biochemistry* **37**, 5074-5085.

Hasunuma, T., Harada, K., Miyazawa, S., Kondo, A., Fukusaki, E., and Miyake, C. (2010) Metabolic turnover analysis by a combination of in vivo ^{13}C -labelling from $^{13}\text{CO}_2$ and metabolic profiling with CE-MS/MS reveals rate-limiting steps of the C_3 photosynthetic pathway in *Nicotiana tabacum* leaves. *J. Exp. Bot.* **61**, 1041-1051.

Hasunuma, T., Kikuyama, F., Matsuda, M., Aikawa, S., Izumi, Y., and Kondo, A. (2013) Dynamic metabolic profiling of cyanobacterial glycogen biosynthesis under conditions of nitrate depletion. *J. Exp. Bot.* **64**, 2943-2954.

Huang, K., Scott, A. I., and Bennett, G. N. (1999). Overexpression, Purification, and Characterization of the Thermostable Mevalonate Kinase from *Methanococcus jannaschii*. *Protein Expr. Purif.* **17**, 33-40.

Hurwitz, J., Weissbach, A., Horecker, B. L., and Smyrniotis, P. Z. (1956) Spinach phosphoribulokinase. *J. Biol. Chem.* **218**, 769-783.

Iino, T., Mori, K., and Suzuki, K. (2010). *Methanospirillum lacunae* sp. nov., a methane-producing archaeon isolated from a puddly soil, and emended descriptions of the genus *Methanospirillum* and *Methanospirillum hungatei*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 2563-2566.

Jain, S., Caforio, A. and Driessen, A. J. (2014) Biosynthesis of archaeal membrane ether lipids. *Front. Microbiol.* **5**, 641.

Jin, L. and Nel, M. (1990) Limitations of the evolutionary parsimony method of phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* **7**, 82-102.

- Jurgens, G. (2002) Molecular phylogeny of Archaea in boreal forest soil, freshwater and temperate estuarine sediment. (University of Helsinki).
- Kasting, J. F. (2004) When methane made climate. *Sci. Am.* **291**, 78-85.
- Kato, N., Higuchi, T., Sakazawa, C., Nishizawa, T., Tani, Y., and Yamada, H. (1982) Purification and properties of a transketolase responsible for formaldehyde fixation in a methanol-utilizing yeast, *Candida boidinii* (Kloeckera sp.) No. 2201. *Biochim. Biophys. Acta.* **715**, 143-150.
- Kato, N., Yurimoto, H. and Thauer, R. K. (2006) The physiological role of the ribulose monophosphate pathway in bacteria and archaea. *Biosci. Biotech. Biochem.* **70**, 10621.
- Kazmierczak, J., and Altermann, W. (2002). Neoproterozoic Biomineralization by Benthic Cyanobacteria. *Science* **298**, 2351.
- Kennedy, M., Mrofka, D., and von der Borch, C. (2008) Snowball Earth termination by destabilization of equatorial permafrost methane clathrate. *Nature* **453**, 642-645.
- Kobayashi, D., Tamoi, M., Iwaki, T., Shigeoka, S., and Wadano, A. (2003) Molecular characterization and redox regulation of phosphoribulokinase from the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Plant Cell Physiol.* **44**, 269-276.
- Koga, Y., Kyuragi, T., Nishihara, M., and Sone, N. (1998) Did archaeal and bacterial cells arise independently from noncellular precursors? A hypothesis stating that the advent of membrane phospholipid with enantiomeric glycerophosphate backbones caused the separation of the two lines of descent. *J. Mol. Evol.* **46**, 54-63.
- Kreel, N. E. and Tabita, F. R. (2007) Substitutions at methionine 295 of *Archaeoglobus fulgidus* ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase affect oxygen binding and CO₂/O₂ specificity. *J. Biol. Chem.* **282**, 1341-1351.

Leipe, D. D., Koonin, E. V., and Aravind, L. (2003) Evolution and Classification of P-loop Kinases and Related Proteins. *J. Mol. Biol.* **333**, 781-815.

León, M., Fernández, A. B., Ghai, R., Sánchez-Porro, C., Rodriguez-Valera, F., and Ventosa, A. (2014) From Metagenomics to Pure Culture: Isolation and Characterization of the Moderately Halophilic Bacterium *Spiribacter salinus* gen. nov., sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 3850-3857.

León, M., Ghai, R., Fernandez, A. B., Sanchez-Porro, C., Rodriguez-Valera, F., and Ventosa, A. (2013) Draft Genome of *Spiribacter salinus* M19-40, an Abundant Gammaproteobacterium in Aquatic Hypersaline Environments. . *Genome Announc.* **1**, e00179-00112.

Lockhart, P. J., Larkum, A. W., Steel, M., Waddell, P. J., and Penny, D. (1996) Evolution of chlorophyll and bacteriochlorophyll: The problem of invariant sites in sequence analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 1930-1934.

Makula, R., and Singer, M. E. (1978) Ether-containing lipids of methanogenic bacteria. *Biochem. Biophys. Res.* **82**, 716-722.

Mangels, D., Kruip, J., Berry, S., Rögner, M., Boekema, E. J., and Koenig, F. (2002) Photosystem I from the unusual cyanobacterium *Gloeobacter violaceus*. *Photosynth. Res.* **72**, 307-319.

Marx, C., Chistoserdova, L., and Lidstrom, M. E. (2003) Formaldehyde detoxifying role of the tetrahydromethanopterin-linked pathway in *Methylobacterium extorquens* AM1. *J. Bacteriol.* **185**, 7160-7168.

Miziorko, H. M. (2000) Phosphoribulokinase: current perspectives on the structure/function basis for regulation and catalysis. *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.* **74**, 95-127.

Mojzsis, S., Arrhenius, G., McKeegan, K. D., Harrison, T. M., Nutman, A. P., and Friend, C. R. L. (1996) Evidence for life on Earth before 3800 million years ago. *Nature* **384**, 55-59.

Muller-Cajar, O., Morell, M, and Whitney, S. M. (2007) Directed evolution of rubisco in *Escherichia coli* reveals a specificity-determining hydrogen bond in the form II enzyme. *Biochemistry*. **46**, 14067-14074.

Nakamura, Y. and Tabata, S., et al., (2003) Complete genome structure of *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, a cyanobacterium that lacks thylakoids. *DNA Res.* **10**, 137-145.

Nash, T. (1953) The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem. J.* **55**, 416-421.

Nelissen, B., Van de Peer, Y., Wilmotte, A., and De Wachter, R. (1995) An early origin of plastids within the cyanobacterial divergence is suggested by evolutionary trees based on complete 16S rRNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* **12**, 1166-1173.

Nelson, N. and Ben-Shem, A. (2002) Photosystem I reaction center: past and future. *Photosynth. Res.* **73**, 193-206.

Nishitani, Y., Yoshida, S., Fujihashi, M., Kitagawa, K., Doi, T., Atomi, H., Imanaka, T., and Miki, K. (2010) Structure-based catalytic optimization of a type III Rubisco from a hyperthermophile. *J. Biol. Chem.* **285**. 39339-39347.

Norris, P., Burton, N. and Foulis, N. (2000) Acidophiles in bioreactor mineral processing. *Extremophiles*. **4**, 71-76.

Ohtomo, Y., Kakegawa, T., Ishida, A., Nagase, T., and Rosing M. T. (2014) Evidence for biogenic graphite in early Archaean Isua metasedimentary rocks. *Nat. Geosci.* **7**, 25-28.

Olson, J. M. (2006) Photosynthesis in the Archean era. *Photosynth. Res.* **88**, 109-117.

Orita, I., Sakamoto, N., Kato, N., Yurimoto, H., and Sakai, Y. (2007) Bifunctional enzyme fusion of 3-hexulose-6-phosphate synthase and 6-phospho-3-hexuloisomerase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**, 439-445.

Orita, I., Sato, T., Yurimoto, H., Kato, N., Atomi, H., Imanaka, T., and Sakai, Y. (2006) The ribulose monophosphate pathway substitutes for the missing pentose phosphate pathway in the archaeon *Thermococcus kodakaraensis*. *J. Bacteriol.* **188**, 4698-4704.

Pearce, F. G. and Andrews, T. J. (2003) The relationship between side reactions and slow inhibition of ribulose-bisphosphate carboxylase revealed by a loop 6 mutant of the tobacco enzyme. *J. Biol. Chem.* **278**, 32526-32536.

Pierce, J., Tolbert, N. E. and Barker, R. (1980) Interaction of ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase with transition-state analogs. *Biochemistry* **19**, 9346-9349.

Porter, M. A., Milanez, S., Stringer, C. D., and Hartman, F. C. (1986) Purification and characterization of ribulose-5-phosphate kinase from spinach. *Arch. Biochem. Biophys.* **245**, 14-23.

Raval, M., Biswal, B., and Biswal, U. C. (2005) The mystery of oxygen evolution: analysis of structure and function of Photosystem II, the water-plastoquinone oxido-reductase. *Photosynth. Res.* **93**, 188-193.

Runquist, J. A., Harrison, D. H., and Miziorko, H. M. (1999) *Rhodobacter sphaeroides* phosphoribulokinase: identification of lysine-165 as a catalytic residue and evaluation of the contributions of invariant basic amino acids to ribulose 5-phosphate binding. *Biochemistry.* **38**, 13999-14005.

Runquist, J. A., and Miziorko, H. M. (2006) Functional contribution of a conserved, mobile loop histidine of phosphoribulokinase. *Protein Sci.* **15**, 837-842.

Saito, Y., Ashida, H., Sakiyama, T., de Marsac, N. T., Danchin, A., Sekowska, A., and Yokota, A (2009) Structural and functional similarities between a ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO)-like protein from *Bacillus subtilis* and photosynthetic RuBisCO. *J. Biol.Chem.* **284**, 13256-13264.

Sakuraba, H. (2003) Cloning, Expression, and Characterization of the First Archaeal ATP-Dependent Glucokinase from Aerobic Hyperthermophilic Archaeon *Aeropyrum pernix*. *J. Biochem.* **133**, 219-224.

Sakuraba, H., Kawakami, R., and Ohshima, T. (2005) First archaeal inorganic polyphosphate/ATP-dependent NAD kinase, from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii*: cloning, expression, and characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 4352-4358.

Salvucci, M., Portis, A. R. Jr, and Ogren, W. L. (1986) Purification of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase with high specific activity by fast protein liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **153**, 97-101.

Sato, T., Atomi, H., and Imanaka, T. (2007) Archaeal type III RuBisCOs function in a pathway for AMP metabolism. *Science* **315**, 1003-1006.

Sato, T., Fujihashi, M., Miyamoto, Y., Kuwata, K., Kusaka, E., Fujita, H., Miki, K., and Atomi, H. (2013) An uncharacterized member of the ribokinase family in *Thermococcus kodakarensis* exhibits myo-inositol kinase activity. *J. Bacteriol. Chem.* **288**, 20856-20867.

Saw, J. H., Schatz, M., Brown, M. V., Kunkel, D. D., Foster, J. S., Shick, H., Christensen, S., Hou, S., Wan, X., and Donachie, S. P. (2013) Cultivation and complete genome sequencing of *Gloeobacter kilaueensis* sp. nov., from a lava cave in Kilauea Caldera, Hawai'i. *PloS One* **8**, e76376.

Schloss, J. V., Phares, E. F., Long, M. V., Norton, I. L., Stringer, C. D., and Hartman, F. C. (1982) Ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase from *Rhodospirillum rubrum*. *Meth. Enzymol.* **90**, 522-528.

Schopf, J. W., and Packer, B. M. (1987) Early Archean (3.3-billion to 3.5-billion-year-old) microfossils from Warrawoona Group, Australia. *Science* **237**, 70-73.

Shih, P., and Kerfeld, C. A. et al., (2013) Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 1053-1058.

Siebers, B., and Schonheit, P. (2005) Unusual pathways and enzymes of central carbohydrate metabolism in Archaea. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 695-705.

Siebert, K., Schobert, P., and Bowien, B. (1981) Purification, some catalytic and molecular properties of phosphoribulokinase from *Alcaligenes eutrophus*. *Biochim. Biophys. Acta.* **658**, 35-44.

Soderberg, T. (2005) Biosynthesis of ribose-5-phosphate and erythrose-4-phosphate in archaea: a phylogenetic analysis of archaeal genomes. *Archaea* **1**, 347-352.

Sulpice, R., Tschoep, H., VON Korff, M., Büssis, D., Usadel, B., Höhne, M., Witucka-Wall, H., Altmann, T., Stitt, M., and Gibon, Y. (2007) Description and applications of a rapid and sensitive non-radioactive microplate-based assay for maximum and initial activity of D-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Plant Cell Environ.* **30**, 1163-1175.

Suzuki, N. N., Koizumi, K., Fukushima, M., Matsuda, A., and Inagaki, F. (2004) Structural basis for the specificity, catalysis, and regulation of human uridine-cytidine kinase. *Structure* **12**, 751-764.

Tabita, F. R., Hanson, T. E., Satagopan, S., Witte, B. H., and Kreel, N. E. (2008) Phylogenetic and evolutionary relationships of RubisCO and the RubisCO-like proteins and the functional lessons provided by diverse molecular forms. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **363**, 2629-2640.

Takagi, M., Nishioka, M., Kakihara, H., Kitabayashi, M., Inoue, H., Kawakami, B., Oka, M., and Imanaka, T. (1997) Characterization of DNA polymerase from *Pyrococcus* sp. strain KOD1 and its application to PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4504-4510.

Takai, K., Nakamura, K., Toki, T., Tsunogai, U., Miyazaki, M., Miyazaki, J., Hirayama, H., Nakagawa, S., Nunoura, T., and Horikoshi, K. (2008) Cell proliferation at 122°C and isotopically heavy CH₄ production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**, 10949-10954.

Tcherkez, G. G., Farquhar, G. D., and Andrews, T. J. (2006) Despite slow catalysis and confused substrate specificity, all ribulose biphosphate carboxylases may be nearly perfectly optimized. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 7246-7251.

Thauer, R. K. (2011) Anaerobic oxidation of methane with sulfate: on the reversibility of the reactions that are catalyzed by enzymes also involved in methanogenesis from CO₂. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**, 292-299.

Tomita, H., Yokooji, Y., Ishibashi, T., Imanaka, T., and Atomi, H. (2012) Biochemical characterization of pantoate kinase, a novel enzyme necessary for coenzyme A biosynthesis in the Archaea. *J. Bacteriol.* **194**, 5434-5443.

Tornabene, T., Wolfe, R. S., Balch, W. E., Holzer, G., Fox, G. E., and Oro, J. (1978) Phytanyl-glycerol ethers and squalenes in the archaebacterium *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J. Mol. Evol.* **11**, 259-266.

Uemura, K., Suzuki, Y., Shikanai, T., Wadano, A., Jensen, R. G., Chmara, W., and Yokota, A. (1996) A Rapid and Sensitive Method for Determination of Relative Specificity of RuBisCO from Various Species by Anion-Exchange Chromatography. *Plant Cell Physiol.* **37**, 325-331.

Valentin-Hansen, P. (1978) Uridine-cytidine kinase from *Escherichia coli*. *Meth. Enzymol.* **51**, 308-314.

Valentine, D. L. (2007) Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 316-323.

Van Dien, S. J., and Lidstrom, M. E. (2002) Stoichiometric model for evaluating the metabolic capabilities of the facultative methylotroph *Methylobacterium extorquens* AM1, with application to reconstruction of C(3) and C(4) metabolism. *Biotechnol. Bioeng.* **78**, 296-312.

Verhees, C., Kengen, S. W., Tuininga, J. E., Schut, G. J., Adams, M. W., De Vos, W. M., and Van Der Oost, J. (2003) The unique features of glycolytic pathways in Archaea. *Biochem. J.* **375**, 231-246.

Vorholt, J. A., Marx, C. J., Lidstrom, M. E., and Thauer, R. K. (2000) Novel formaldehyde-activating enzyme in *Methylobacterium extorquens* AM1 required for growth on methanol. *J. Bacteriol.* **182**, 6645-6650.

Vorholt, J. A. (2002) Cofactor-dependent pathways of formaldehyde oxidation in methylotrophic bacteria. *Arch. Microbiol.* **178**, 239-249.

Wacey, D., Kilburn, M. R., Saunders, M., Cliff, J., and Brasier, M. D. (2011) Microfossils of sulphur-metabolizing cells in 3.4-billion-year-old rocks of Western Australia. *Nat. Geosci.* **4**, 698-702.

Walker, J., Saraste, M., Runswick, M. J., and Gay, N. J. (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* **1**, 945-951.

Watson, G., Yu, J. P., and Tabita, F. R. (1999) Unusual ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase of anoxic Archaea. *J. Bacteriol.* **181**, 1569-1575.

Wissenbach, U., Ternes, D., and Uden, G. (1992) An *Escherichia coli* mutant containing only demethylmenaquinone, but no menaquinone: effects on fumarate, dimethylsulfoxide, trimethylamine N-oxide and nitrate respiration. *Arch. Microbiol.* **158**, 686-73.

Woese, C. R., and Fox, G. E. (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**, 5088-5090.

Woese, C. R., Kandler, O., and Wheelis, M. L. (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 4576-4579.

Wolosiuk, R. A. and Buchanan, B. B. (1978) Regulation of chloroplast phosphoribulokinase by the ferredoxin/thioredoxin system. *Arch. Biochem. Biophys.* **189**, 97-101.

Worm, P., Stams, A. J., Cheng, X., and Plugge, C. M. (2011) Growth- and substrate-dependent transcription of formate dehydrogenase and hydrogenase coding genes in *Syntrophobacter fumaroxidans* and *Methanospirillum hungatei*. *Microbiology.* **157**, 280-289.

Yurimoto, H., Kato, N., and Sakai, Y. (2005) Assimilation, dissimilation, and detoxification of formaldehyde, a central metabolic intermediate of methylotrophic metabolism. *Chem. Rec.* **5**, 367-375.

Yurimoto, H., Kato, N., and Sakai, Y. (2009) Genomic organization and biochemistry of the ribulose monophosphate pathway and its application in biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **84**, 407-416.

Zeikus, J. G. and Bowen, V. G. (1975) Fine structure of *Methanospirillum hungatii*. *J. Bacteriol.* **121**, 373-380.

安達 昇. (2006) Calvin cycle 鍵酵素 phosphoribulokinase の分子進化研究. 修士論文 (奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科)

遠藤 千夏子. (2013) アーキアが有する光合成カルビンサイクル酵素 phosphoribulokinase ホモログの酵素学的解析. 修士論文 (奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科)

川上 真裕子. (2016) メタン産生アーキア *Methanosaeta concilii* が有する RuBisCO の解析. 卒業論文 (神戸大学 発達科学部)

木津 奈都子. (2013) 光合成における CO₂ アクセプター生成酵素 PRK の活性調節機構の解明. 修士論文 (大阪大学大学院 工学研究科)

河野 卓成. (2011) 光合成 CO₂ 固定回路 Calvin cycle の完成に向けた RuBisCO と Phosphoribulokinase の分子進化の解析. 修士論文 (奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科)

Annenberg Learner Unit 1: Many Planets, One Earth

<http://www.learner.org/about/>

Snowball Earth

<http://www.snowballearth.org/index.html>

論文目録

学位論文の主たる部分を公表した論文

(題名、全著者名、公表時期、雑誌名、巻、ページ)

『A RuBisCO-mediated carbon metabolic pathway in methanogenic archaea』
Takunari Kono, Sandhya Mehrotra, Chikako Endo, Natsuko Kizu, Mami
Matusda, Hiroyuki Kimura, Eiichi Mizohata, Tsuyoshi Inoue, Tomohisa
Hasunuma, Akiho Yokota, Hiroyoshi Matsumura, and Hiroki Ashida. (2017)
Nat. Commun. **8**, 14007.