

(研究題目) **生物炭酸固定に及ぼす環境的要因**
(Environmental Factors on Microbial CO₂-Fixation)

研究代表者 児玉 徹 東京大学大学院応用生命工学専攻教授
Prof. Tohru Kodama, Dept. of Biotechnology, Graduate School of
Agriculture and Life Sciences, The University of Tokyo.
協同研究者 五十嵐泰夫 東京大学大学院応用生命工学専攻助教授
Associate Prof. Yasuo Igarashi, Dept. of Biotechnology, Graduate School
of Agriculture and Life Sciences, The University of Tokyo.
石井正治 東京大学大学院応用生命工学専攻助手
Research Associate Masaharu Ishii, Dept. of Biotechnology, Graduate
School of Agriculture and Life Sciences, The University of Tokyo.
都筑幹夫 東京薬科大学理学部教授
Prof. Mikio Tsuzuki, Faculty of Science, Tokyo Pharmacy College.

(Summary)

Carbon dioxide fixation in various environments on the earth was examined. Non-Calvin-type fixation is dominant in extreme environment, but the Calvin-type CO₂ fixation functions in normal environment. Microorganisms use various strategies to adapt to versatile nutrient conditions on the earth.

1. 研究目的

生物炭酸固定は、地球上の有機物の合成・供給反応として極めて重要な役割を果たしている。当研究は、生物炭酸固定の環境的要因の全容を明らかにすべく、様々な環境に生育する炭酸固定生物についてそこで働く炭酸固定経路および炭酸固定酵素の解析を試みた。

2. 研究経過および成果

(1) 放射性化合物を用いないRubisCO活性測定法の開発

地球上で最も重要な炭酸固定経路であるカルビンサイクルの鍵酵素であるRubisCOの活性は従来¹⁴Cを用いた方法で行なわれていた。しかしながら、実験の繁雑さ、RI廃棄物の処理等に問題があるので、新たにイオンクロマトグラフィーを用いる方法を開発した。この方法によってカルボキシラーゼ活性、オキ

シゲナーゼ活性を同時に測定する事が可能になり、RubisCOの炭酸固定効率を評価するのに重要なスペシフィックファクターの算定が容易になった。

(2) 好アルカリ性細菌の炭酸固定

炭酸固定能の高い好アルカリ性ギ酸資化性菌、Moraxella strain M-2 を取得、菌体よりカルビンサイクルの鍵酵素RubisCOを精製した。本菌由来のRubisCOの炭酸ガスに対するKm値は他生物由来のそれよりもかなり高かった。アルカリ環境では、炭酸は炭酸イオンまたは重炭酸イオンの形で濃縮されており、Km値の高さはその生育環境に起因していると考えられた。またこのKm値の違いの原因をRubisCO構造の面から明らかにすべく、N末端アミノ酸シーケンス等から遺伝子を取得、現在そのシーケンスを解析中である。

(3) 好塩性古細菌の炭酸固定

高塩環境における炭酸固定は、生態学的にも進化系統的にもまた農業の塩害対策という実用的な面からも重要である。Haloferax属を中心に好塩性古細菌に微弱ながら耐塩性または好塩性のRubisCO活性が存在することを確認した。Haloferaxは光または化学エネルギーを用いての独立栄養はできないが、有機化合物の欠乏した環境に於いて強いRubisCO活性を示した。すなわち本菌においては、炭素源の枯渇に対応してRubisCO遺伝子が発現し、その結果炭酸固定による有機物の補充が行なわれると考えられた。

(4) 高温性細菌Pseudomonas hydrogenothermophilaのRubisCOとその遺伝子

Pseudomonas hydrogenothermophilaは細胞倍化時間約1時間と、現在知られている全生物中最も炭酸固定能力の高い菌である。本菌からRubisCOを精製し、さらにその遺伝子をクローニング、シーケンシングした。しかし、RubisCOの構造の面からは本菌の高い炭酸固定能を説明することはできなかった。しかし、RubisCO遺伝子下流に機能不明のORFが存在する事を確認し、この遺伝子産物がRubisCOの機能的発現に関与することを明らかにした。

(5) 海洋性炭酸固定細菌MH-110株の炭酸固定

海洋由来の細菌Hydrogenovibrio marinus MH-110株は、炭酸ガスを炭素源として約1時間弱毎に分裂を繰返すという極めて旺盛な生育を示す炭酸固定生物であり、海洋における炭酸固定の実体を明らかにする上でも応用上も極めて興味深い。本菌は水素をエネルギー源、炭酸ガスを炭素源として、短時間で高濃度にまで培養することが可能であった。さらに、特に窒素制限下では著量のグ

リコーゲンが蓄積されることを明らかにした。本菌は、炭酸ガスを原料とした有用有機産物の生産のための固定バイオカタリストとして優れた能力を持つことが判明した。

本菌は、3種類のRubisCO遺伝子(2つは L_3S_3 型 (cbbL₁S₁およびcbbL₂S₂)、1つは L_2 型 (cbbM))を持っている。これら3種のRubisCO遺伝子のすべてについてクローニング、シーケンシングを終了した。同一菌株が3つのRubisCO遺伝子を持つ例は他になく、その生理的意義に興味を持たれた。サザーン解析の結果、低炭酸ガス濃度では主にcbbL₁S₁が、高炭酸ガス濃度では主にCbbMが細胞内で発現していることが確認された。精製蛋白での比較によると、 L_3S_3 -I (cbbL₁S₁の遺伝子産物)の方が L_2 (CbbMの遺伝子産物)よりも炭酸ガスに対する新和性が高かった。本菌は絶対独立栄養生物であり、その生育の為に炭酸固定は必要不可欠とされる。従って、本菌はその生残り戦略として炭酸ガスに対するKm値の異なる複数のRubisCO遺伝子を持ち、環境の炭酸ガス濃度にあわせて適当な方を発現させていると考えられた。なおcbbL₂S₂は、サザーン解析からは炭酸ガス濃度に関わらず僅かに翻訳されているようであるが、菌体内に蛋白質としては確認されていない。すなわち炭酸固定酵素としての役割は低いと考えられた。

(5) 高温性微細藻類

日本およびタイ国の温泉より、高温性の光合成微細藻類を取得した。これらはいずれもラン藻類に属し、60°Cでは良く生育したが、70°Cでの独立栄養(有機物を全く必要としない生育)は見られなかった。

日本の温泉より取得した菌株中の1株、Synechococcus sp.よりRubisCOを精製した。本菌由来のRubisCOは、現在までに報告された精製RubisCO中最も高い熱安定性を有していた。本菌のRubisCO遺伝子 (cbbLS) をクローニング、シーケンシングした。さらにジーンカセットを作成し、発現ベクターを用いることにより、本酵素を活性を持った状態で大腸菌内で大量に発現させることが可能となった。本RubisCOは植物のRubisCOと相同性が高く、今後この発現系を利用してRubisCO機能の改変(スペシフィックファクターの改良)等の研究が可能となった。

タイ国チェンマイ市近郊の温泉より高温性微細藻類を取得した。本菌は、Chroococcidiopsisに属し、高温性の他、アルカリpH領域で良く生育する、NOx

やSO_xをN源、S源として利用できる、高炭酸ガス濃度でも生育が阻害されない等、燃焼後の排気炭酸ガスの有機化触媒としての優れた性質を示した。現在、フォトバイオリクターを用いた本菌による炭酸ガスの効率的有機化を研究中である。

(6) Hydrogenobacter thermophilusの還元的TCA回路関連酵素の精製と性質

70°C以上に生育最適温度を持つ化学独立栄養細菌Hydrogenobacter thermophilusは好気性の炭酸固定生物としては唯一、還元的TCA回路により炭酸固定を行なっていると考えられている。本菌より還元的TCA回路の2つの重要な炭酸固定酵素であるピルビン酸および2-オキソグルタル酸酸化還元酵素を精製した。そして両酵素が本菌より調製したフェレドキシンを酸化還元のコファクターとしていることを明らかにした。

(7) 好熱好酸性古細菌の炭酸固定

好熱好酸性古細菌Acidianus brierleyiの新規炭酸固定経路の解明を、主に酵素活性の測定と生産物の同定によって行なった。その結果、本菌は従来言われていた還元的TCA回路ではなく、C₂→C₃→C₄→2C₂というサイクルによって炭酸固定を行なっていると考えられたが、いまだ鍵反応となるC₄→2C₂の部分の反応の詳細が未解明となっている。

(8) 深海における炭酸固定

深海底の熱水鉱床付近で化学独立栄養細菌によって行なわれている炭酸固定および炭酸固定酵素が地上のそれとどの様な関係にあるか極めて興味深い。しかし、深海探索船“しんかい2000”からよいサンプルを得ることができず、深海の化学独立栄養細菌（水素または硫黄酸化菌）を取得することはできなかった。

(9) 太古における炭酸固定の推定

以上、現在の地球上の様々な環境における様々な炭酸固定の様式から、太古の地球上において有機酸代謝を利用した炭酸固定が成立し、それによって地球上に有機物が蓄積された可能性があることを示した。

3. 発表論文リスト

3-1. 学術雑誌発表 (1992-94)

- (1) N. Hayashi et. al., Isolation and Cultivation of Thermophilic Cyanobacteria from Hot Springs of Northern Thailand. *J. Ferment. Bioeng.*, 78, 179 (1994).
- (2) S.Y. Chung et. al., Purification of form L2 RubisCO from a marine obligately autotrophic hydrogen-oxidizing bacterium, *Hydrogenovibrio marinus* strain MH-110. *FEMS Microbiol. Lett.*, 109, 49 (1993).
- (3) H. Nishihara et. al., Production and Properties of Glycogen in the Marine Obligate Chemolithoautotroph, *Hydrogenovibrio marinus*. *J. Ferment. Bioeng.* 75, 414 (1993).
- (4) T. Yaguchi et.al., Cloning, Sequencing and Overexpression of the Thermophilic Cyanobacterium Gene for the Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase. *J. Ferment. Bioeng.*, 75, 1 (1993).
- (5) T. Yaguchi et. al., Purification of RubisCO from the Thermophilic Cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain a-1. *J. Ferment. Bioeng.*, 73, 348 (1992).

3-2. プロシーディング、報告書 (1992-94)

- (1) Y. Igarashi et. al., Biomass Production from Carbon Dioxide by a Marine Hydrogen Oxidizing Bacterium, *Hydrogenovibrio marinus*. *Biochemical Engineering for 2001*, pp719-722, Springer-Verlag (1992).
- (2) Y. Xu et. al., A Study on the Physiological Function of Intracellular Glycogen in the Obligately Chemolithoautotroph *Hydrogenovibrio marinus*. *Ann. Rep. ICBiotech.* 15, 213 (1992).
- (3) Y. Igarashi et. al., Isolation and Cultivation of Thermophilic Cyanobacteria from Thai and Japanese Hot Springs. *Ann. Rep. ICBiotech.* 15, 354 (1992).

3-3. 口頭発表 (平成4-6年度)

日本農芸化学会大会 (11件)、同関東支部大会 (3件)、日本生物工学会大会 (3件)、日本生化学会大会 (2件)。その他シンポジウム等で多数講演。

3-4. その他

現在印刷中、投稿中および投稿準備中の論文、各数点。