

極限環境から分離された好熱性水素細菌の代謝解析

(書籍『極限環境微生物の先端科学と社会実装最前線』 第2章極限環境微生物の解析 第3節)

亀谷将史、新井博之、石井正治

東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻、東京大学微生物科学イノベーション連携研究機構

1. はじめに

水素細菌（水素酸化細菌）は、水素をエネルギー源、二酸化炭素を炭素源として生育する独立栄養性生物である(亀谷将史 *et al.*, 2020)。光合成細菌など他の独立栄養性生物と比較して増殖が速く、高いCO₂固定能を有することから、CO₂削減やCO₂資源化への利用という観点で近年注目されている。

水素細菌は大腸菌などのモデル細菌とはエネルギー供給系や炭素代謝系が大きく異なるが、その特異な微生物代謝の全体像はどのように明らかにされてきたのだろうか。極限環境微生物の研究において、モデル生物とはかけ離れた菌の代謝解明はしばしば避けられない課題となる。その一例として本節では、極限環境から単離された水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 について網羅的な代謝解析を進めた一連の研究を紹介する。

2. *H. thermophiles* TK-6 の単離同定

水素細菌の単離や性状解析は 1970 年代までに様々な菌で進められたが、70°Cを超える好熱環境で生育可能な菌は 1978 年に 1 例（現在の *Hydrogenibacillus schlegelii* MA48）しか報告されていなかった。同時期に筆者らの研究室では、伊豆半島や奥鬼怒などの温泉から水素細菌の単離が試みられ、H₂をエネルギー源、CO₂を炭素源とした好気条件で高い生育能を示す株が伊豆の峯温泉から単離された(Kawasumi *et al.*, 1980)。本菌は 70°Cで最大の増殖速度（倍加時間約 2 時間）を示し、新種・新属として *H. thermophilus* TK-6 と命名された(Kawasumi *et al.*, 1984)。

それまで報告されていた水素細菌はいずれも従属栄養的にも生育するのに対し、TK-6 は有機物のみを炭素源とした条件では生育せず、水素細菌として初めての絶対独立栄養性菌として報告された(Shiba *et al.*, 1984)。また当時知られていた好気性独立栄養性生物はいずれもカルビン回路で炭酸固定していたのに対し、本菌は還元的 TCA 回路 (rTCA 回路；本節 6.1 で後述) という、TCA 回路を逆回転させた特異な経路で炭酸固定することも初期の研究で示されている(Shiba *et al.*, 1985)。

3. 菌体構成成分

本菌が既知の菌とは大きく異なる性質を備えていることは、菌体を構成する低分子化合物・タンパク質の解析からも明らかになっていった。例えば、呼吸鎖などの電子授受に関わるキノンとして本菌は既知の分子を有さず、新規含硫キノンであるメチオナキノンが発見された(Ishii *et al.*, 1987c) (図 1A)。同様に電子授受に関わるタンパク質として cytochrome *c*₅₅₂ (Ishii *et al.*, 1987a; Sanbongi *et al.*, 1989a; Sanbongi *et al.*, 1989b)が発見され、その特異な熱安定性やフォールディング機構などについて研究が進展した(Hasegawa *et al.*, 1998; Hasegawa *et al.*, 1999; Travaglini-Allocatelli *et al.*, 2005)。さらに細胞膜を構成するリン脂質についても、新規アミノリン脂質が発見されている(Yoshino *et al.*, 2001) (図 1B)。

4. 系統分類および類縁菌の性質

上述のように、他の細菌には見られない代謝や菌体構成成分を有することから、本菌が特異な系統的位置にあることは分子系統解析以前から予想されてきた(Igarashi & Kodama, 1990)。16S rRNA 配列を基にした系統解析が可能な時代になると、本菌は 1992 年に単離された超好熱菌 *Aquifex pyrophilus* と近縁であり、バクテリアドメインの中で最も早くに他から分岐した系統であることが提唱された(Burggraf *et al.*, 1992; Pitulle *et al.*, 1994)。同様の結果は、ゲノム中の複数の遺伝子を用いた系統解析からも支持されている(Oshima *et al.*, 2012)。他のバクテリアでは失われた古い代謝様式を本菌が残す背景には、このように古い進化起源があると考えられる。

本菌の近縁種は様々な環境から単離されている。酸性環境からは至適 pH 3.0~4.0 の *Hydrogenobaculum acidophilum* (旧名 *Hydrogenobacter acidophilus*) (Shima & Suzuki, 1993)、沿岸部の食塩泉からは好塩性の *Hydrogenobacter halophilus* (Nishihara *et al.*, 1990)、深海からは従属栄養性の *Hydrogenobacter subterraneus* (Takai *et al.*, 2001)が報告されている。また、窒素固定能を有する *H. thermophilus* 類縁株(Nishihara *et al.*, 2018a; Nishihara *et al.*, 2018b)も近年見つかかり、近縁種間でも代謝多様性があることが明らかになりつつある。

現在の系統分類で *Hydrogenobacter* 属は、*Aquifex* 属や *Thermocrinis* 属とともに *Aquificales* 目 *Aquificaceae* 科に分類され、同目の *Hydrogenothermaceae* 科や *Desulfurobacteriales* 目 *Desulfurobacteriaceae* 科(Gupta & Lali, 2013)と共に *Aquificota* 門 (旧 *Aquificae* 門) を形成している(Gupta, 2014; Reysenbach, 2015) (図 2)。

Aquificota 門に属する菌の多くは微好気性または嫌気性であり、30%を超える酸素存在下でも旺盛に生育する TK-6 は例外的な存在である。さらにこれら類縁菌が有する rTCA 回路は、酸素感受性の鍵酵素や還元的な細胞内環境を要し、しばしば「嫌気性あるいは微好気性生物にしか存在しえない」と言及される。すなわち本菌は、*Aquificota* 門細菌としても rTCA 回路を有する生物としても、異例の酸素耐性を備える菌と言える。このような酸素耐性機構について研究が進められ、alkyl hydroperoxide reductase や ferriperoxin と呼ばれる新規タンパク質による本菌特有の酸化ストレス耐性機構が見つかっている(Sato *et al.*, 2012a; Sato *et al.*, 2014; 佐藤由也 *et al.*, 2013)。

5. ゲノム

本菌のコンプリートゲノムは 2010 年に解読・公開された(Arai *et al.*, 2010)。本菌のゲノムサイズは約 1.7 Mbp、タンパク質をコードする遺伝子総数は 1,864 と、一般的なバクテリアよりもコンパクトな構成から成る。多くの従属栄養細菌は様々な栄養条件に適応し、各条件下で最適な代謝セットを切り替える複雑な代謝制御機構を有する。一方、絶対独立栄養性細菌として貧栄養な極限環境を主たる生育環境として進化してきた本菌はそうした複雑な制御系を有さず、天然のミニマムゲノムファクトリーと言えるシンプルな代謝をゲノムサイズに反映している。

6. 代謝酵素

6.1. CO₂固定代謝 (rTCA 回路)

上述のように本菌は rTCA 回路という特徴的な経路で CO₂を固定することから、この経路を構成する各酵素について詳細に解析が進められた (図 3A)。その結果、本菌の rTCA 回路は、TCA 回路とも他菌で知られる rTCA 回路とも異なる点があることが明らかになった。以下の 2 点に大別されるこれら特徴はいずれも、TCA 回路を CO₂固定方向に回すという、エネルギー的に不利な反応を駆動するのに適した性質である。

6.1.1. 強力な還元力による駆動

TCA 回路での pyruvate および 2-oxoglutarate (2-OG)の脱炭酸は、それぞれ pyruvate dehydrogenase (PDH)と 2-OG dehydrogenase (OGDH)によって、NAD⁺を電子受容体として不可逆的に触媒される (図 3B)。rTCA 回路ではこの逆反応を進行させるため、pyruvate:ferredoxin oxidoreductase (POR) (Ikeda *et al.*, 2006; Ikeda *et al.*, 2010; Yoon *et al.*, 1997)と 2-OG:ferredoxin oxidoreductase (OGOR) (Ikeda *et al.*, 2005; Ishii *et al.*, 1996)が代わりに用いられる (図 3A)。両酵素は NADH ではなく ferredoxin (Ikeda *et al.*, 2005; Ishii *et al.*, 1996)を電子供与体とし、炭酸固定反応を可逆的に触媒する。TK-6 由来 ferredoxin である Fd1 (Ikeda *et al.*, 2005)の酸化還元電位は、NADH の-340 mV より顕著に低い-492 mV (中村ら, 未発表) または-485 mV (Li & Elliott, 2016)であり、POR/OGOR 反応の-540 mV に近い。すなわち rTCA 回路では、酸化還元電位の低い ferredoxin を還元力とすることで、エネルギー的に不利な炭酸固定反応を駆動していると言える(Kameya *et al.*, 2020)。なお TK-6 における ferredoxin 還元系については、NAD(P)H との電子授受を触媒する ferredoxin-NADP reductase が同定されているものの(Ikeda *et al.*, 2009)、詳細は明らかになっていない。

同様に強い還元力による駆動は、fumarate/succinate 間の酸化還元反応でも見られる。TCA 回路でこの酸化反応

を触媒するのは呼吸鎖 Complex II として知られる succinate dehydrogenase (SDH) であり、電子はキノンへ渡される。一方 TK-6 で見つかった新規 fumarate reductase (FRD) は、キノンよりも酸化還元電位の低い NADH を電子供与体とすることで fumarate を succinate に不可逆的に還元し、rTCA 回路の方向性を決定づけている(Miura *et al.*, 2008)。

6.1.2. 二段階反応での ATP 消費による駆動

TCA 回路で isocitrate から 2-OG への酸化的脱炭酸は isocitrate dehydrogenase (ICDH)によって触媒される。この逆反応は炭酸固定反応を含み $\Delta G'^{\circ} + 8 \text{ kJ}$ (Fuchs, 2011) とエネルギー的に不利であるが、TK-6 の rTCA 回路では 2-OG carboxylase (OGC)と oxalosuccinate reductase (OSR; ICDH と相同)の二酵素によって 2-OG が isocitrate に変換される(Aoshima *et al.*, 2004a; Aoshima & Igarashi, 2006; Aoshima & Igarashi, 2008) (図 3)。まず OGC が ATP 加水分解を駆動力に 2-OG をカルボキシル化し、生成物を OSR が還元することで、トータル $\Delta G'^{\circ} - 25 \text{ kJ}$ の発エルゴン反応としている。

同様の二段階反応は、citrate の開裂・生成ステップでも見られる。TCA 回路においては citrate synthase (CS)が acetyl-CoA と oxaloacetate を縮合し citrate を生成するが、本反応の逆反応は $\Delta G'^{\circ} + 37.6 \text{ kJ}$ とエネルギー的に不利である。TK-6 でこの citrate 開裂は citryl-CoA synthetase (CCS)と citryl-CoA lyase (CCL; CS と相同) により触媒される(Aoshima *et al.*, 2004b; Aoshima *et al.*, 2004c)。CCS が ATP 依存的に citrate を citryl-CoA に活性化し、トータル $\Delta G'^{\circ} + 4 \text{ kJ}$ で反応進行を可能にしている。

6.1.3. rTCA 回路の多様性と進化

上述の ATP 依存的な駆動機構の有無は、rTCA 回路を有する生物間でも違いが見られる。*Chlorobium limicola* をはじめとする多くの生物種は、CCS と CCL が融合した ATP citrate lyase を有し、また OGC を欠くという点で TK-6 とは異なる。*C. limicola* と同様の酵素構成の rTCA 回路は *Aquificota* 門近縁種でも見られ、水平伝達による代謝進化が推測されている(Giovannelli *et al.*, 2017)。また近年は、CCS/CCL も ATP citrate lyase も有さず CS のみで炭酸固定経路として機能する例が発見されるなど(Mall *et al.*, 2018; Nunoura *et al.*, 2018)、rTCA 回路の構成に多様性があることが示されている。

本菌の rTCA 回路は、回路内の点対称の位置で類似した反応が 2 回ずつ繰り返されていることを特徴とする。すなわち、acetyl-CoA を起点として pyruvate、oxaloacetate へのカルボキシル化と malate への還元が起きるが、類似の反応は炭素鎖が 2 長い succinyl-CoA を起点としても繰り返される。また、succinyl-/citryl-CoA の合成反応も類似反応の繰り返しである。こうした回路の対称性から、本菌のような構成の rTCA 回路を祖先型とし、一部遺伝子の欠失・融合により *C. limicola* などの回路が派生したと推測されている(Giovannelli *et al.*, 2017)。脱炭酸方向に進むのには不必要な酵素を欠く TCA 回路も同様に対称性を失っており、TK-6 で見られるような rTCA 回路が TCA 回路の祖先型代謝と考えられ、それを支持する酵素学的研究結果も報告されている(Verschueren *et al.*, 2019)。

6.2. 水素酸化代謝

ヒドロゲナーゼは H_2 のプロトンへの酸化を可逆的に触媒する酵素であり、水素細菌のエネルギー・還元力獲得に必須な酵素である(亀谷将史 *et al.*, 2020)。TK-6 の膜画分からは cytochrome *c*₅₅₂ やメチオナキノンを水素依存的に還元する活性が検出され、ヒドロゲナーゼ Hox が精製されている(Ishii *et al.*, 1987b; Ishii *et al.*, 2000)。また、遺伝子クローニング(Ueda *et al.*, 2007)やゲノム解析によって、Hox を含む 5 種類のヒドロゲナーゼ様遺伝子がこれまでに見つかった。これら酵素の生理学的機能の詳細は明らかになっていないが、上述の Hox 破壊株では高酸素条件下で生育できなくなるという結果が得られている(山口ら, unpublished)。Hox は *Aquificaceae* 科の中でも *Hydrogenobacter* 属など限られた菌種にしか存在せず、TK-6 に特有の酸素耐性に寄与するヒドロゲナーゼだと推測される。

6.3. 窒素代謝

6.3.1. 嫌気呼吸代謝(脱窒)

TK-6 は好気環境下だけではなく嫌気でも生育可能であり、酸素の代わりに硝酸を電子受容体とした脱窒を行う(Suzuki *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2006a)。本菌で脱窒反応の触媒やその補因子生合成に必要な酵素については生化学的解析が進められ(Haufschildt *et al.*, 2014; Suzuki *et al.*, 2006b)、またマイクロレイなどによる転写解析によって脱窒関連酵素などの発現が好気・嫌気条件に応答して発現することが明らかになっている(Kameya *et al.*, 2017)。

これら酵素のうち異化型 nitrate reductase という膜酵素については、既知のバクテリア酵素は細胞質側に局在しプロトン勾配を形成するのに対し、本菌やアーキアの酵素はプロトン勾配を形成できないペリプラズム側に局在することが明らかになった(Kameya *et al.*, 2017)。この発見は、エネルギー生産効率の低い後者のタイプから高効率な前者のタイプへの進化、すなわちバクテリアの脱窒機構がエネルギー生産効率を高める方向に進化してきたことを示している。

6.3.2. 窒素同化・アミノ酸合成

CO₂ 固定(炭素同化)のみならず窒素同化においても、本菌からは新規な酵素・代謝学的性質が多く見ついている(Kameya *et al.*, 2006; Kameya *et al.*, 2007; Kameya *et al.*, 2010)。

本菌はアンモニアおよび硝酸を窒素源として同化するが、経路中の還元反応を触媒する glutamate synthase と nitrate synthase は ferredoxin を電子供与体とする(Kameya *et al.*, 2017)。一般的なバクテリアでこれら酵素は NAD(P)H を電子供与体とし、ferredoxin 依存型酵素はシアノバクテリアや植物など光合成生物に特有とみなされていた。NAD(P)H よりも原始的な電子キャリアとされる ferredoxin (Eck & Dayhoff, 1966; Hall *et al.*, 1971)を保存する窒素同化代謝は、進化的に古い形質を残す本菌に特徴的であり、また炭素・窒素同化代謝の共進化としても興味深い。

また本菌のゲノム中には、当時 Gly, Ser 生合成に必要とされた酵素遺伝子の一部を欠き、その生合成経路に興味を持たれた。このミッシングリンクを埋める酵素として、本菌からは既存酵素と相同性を有さない新規な phosphoserine phosphatase が発見され、本菌のみならずシアノバクテリアなど様々な生物種の Ser 生合成経路がこの新規酵素によって触媒されていることが示された(Chiba *et al.*, 2012a; Chiba *et al.*, 2012b; Chiba *et al.*, 2012c; Chiba *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2016)。

6.4. 硫黄代謝

本菌は水素をエネルギー源としたときに高い増殖能を示すが、水素の代わりにチオ硫酸を電子供与体としても生育できる。このための代謝経路として、Sox と呼ばれるチオ硫酸酸化経路が本菌では機能している(Bagchi & Ghosh, 2011; Sano *et al.*, 2010)。ヒドロゲナーゼが水素存在時にのみ発現誘導されるのに対し、チオ硫酸酸化関連遺伝子はチオ硫酸の有無に関わらず恒常的に発現する(Sato *et al.*, 2012b)。これは、本菌のエネルギー生産においてチオ硫酸酸化が土台となる代謝であることを示している。

硫黄化合物はエネルギー源としてだけではなく、各種含硫代謝物の原料として必須である。本菌では硫黄同化代謝も研究されており、含硫アミノ酸である Cys や Met の生合成において新規酵素や新規経路が見ついている(中山ら, unpublished)。

7. 水素細菌の応用可能性

水素細菌はその研究の黎明期から、バイオマスやタンパク質抽出物を single cell protein (SCP) として飼料・食品へ活用することが議論されてきた(五十嵐泰夫, 1987)。一般的な SCP 生産では糖類などの有機物を原料とするが、水素細菌は有機物を必要とせず、培養廃液がクリーンという特長も備える。20 世紀半ばの取り組みではこうした社会実装には至らなかったが、近年の社会情勢の変化により水素細菌を SCP として利用することに再び関心

が集まっている(平野伸一, 2023)。また、H₂ や CO₂ などのガスを原料とするガス発酵技術の発展もこうした取り組みを後押ししている(亀谷将史 *et al.*, 2020)。TK-6 以外にも優れた増殖能を示す水素細菌として、*Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1 や *Hydrogenovibrio marinus* MH-110 などが筆者らの研究室で得られており、こうした水素細菌の活用も期待される(西原宏史, 2001)。

SCP としての利用の他に、水素細菌を改変し特定の有用物質を生産させる取り組みも進められている。経産省や産業技術総合開発機構 (NEDO) のグリーンイノベーション基金事業では「バイオものづくり技術による CO₂ を直接原料としたカーボンリサイクルの推進」が目標として掲げられるとともに、独立栄養性生物、その中でも特に水素細菌が有望な生物種として挙げられ、物質生産への活用が期待されている。また、水素細菌そのものを物質生産ホストとするだけでなく、rTCA 回路など本菌で発見された新規酵素を用いて有価物を生産することも検討されている(Aoshima, 2007)。

8. 終わりに

本節では、好熱性水素細菌 *H. thermophilus* TK-6 について今日まで 40 年以上にわたる研究史を紹介した。本菌の特殊性は新規菌体構成成分を発見した初期の研究から示唆され、その後 CO₂ 固定や水素酸化といった本菌特有の代謝について詳細な生化学的解析や系統解析を通じて確固たるものとして示された。さらに近年は、本菌に特有な代謝を対象とした研究にとどまらず、呼吸やアミノ酸合成といった生物普遍的な代謝においても新たな発見が続いている。

これら発見を俯瞰したとき、その多くは rTCA 回路など本菌や限られた類縁菌でのみ保存される代謝システムに根ざしたものである。このことは、TK-6 や *Aquificota* 門細菌の特殊性やその独自の進化過程、また生物における代謝の多様性を改めて感じさせる。一方で、他の生物でも共通する機構でありながら本菌で発見されるまで見過ごされてきた例もまた多い。こうした生物普遍的な代謝機構が近年でも本菌から発見されていることは、よく知られた菌の基本的な代謝においても今なお未知の機構が数多く残されていること、また進化系統的に特殊な位置にある本菌は普遍的機構を明らかにする上でも優れた研究対象であることを示している。

水素細菌の代謝については、本菌の研究によって初めて明らかになった知見が多い。水素細菌の社会的な活用は近年強く期待されており、その基盤となる各種水素細菌の代謝理解に本菌の研究成果が大きく貢献すると考えられる。

一般的なバクテリアとは系統的に大きく異なる本菌には、今なお解かれていない謎が多い。本菌のきわめて高い増殖能や酸素耐性を支える機構や、本菌で見つかった新規化合物や各種代謝物の生合成経路、ゲノム中に多く残る機能未知遺伝子など、基礎科学的にも応用的にも重要な問いの解決が望まれる。本菌のさらなる研究により、生命の多様性や普遍性、また水素細菌の社会的利用に関わる発見が今後も続くことを期待したい。

9. 引用文献

Aoshima, M., Ishii, M. & Igarashi, Y. (2004a). A novel biotin protein required for reductive carboxylation of 2-oxoglutarate by isocitrate dehydrogenase in *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *Mol Microbiol* **51**, 791-798.

Aoshima, M., Ishii, M. & Igarashi, Y. (2004b). A novel enzyme, citryl-CoA lyase, catalysing the second step of the citrate cleavage reaction in *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *Mol Microbiol* **52**, 763-770.

Aoshima, M., Ishii, M. & Igarashi, Y. (2004c). A novel enzyme, citryl-CoA synthetase, catalysing the first step of the citrate cleavage reaction in *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *Mol Microbiol* **52**, 751-761.

Aoshima, M. & Igarashi, Y. (2006). A novel oxalosuccinate-forming enzyme involved in the reductive carboxylation of 2-

oxoglutarate in *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *Mol Microbiol* **62**, 748-759.

Aoshima, M. (2007). Novel enzyme reactions related to the tricarboxylic acid cycle: phylogenetic/functional implications and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **75**, 249-255.

Aoshima, M. & Igarashi, Y. (2008). Nondecarboxylating and decarboxylating isocitrate dehydrogenases: oxalosuccinate reductase as an ancestral form of isocitrate dehydrogenase. *J Bacteriol* **190**, 2050-2055.

Arai, H., Kanbe, H., Ishii, M. & Igarashi, Y. (2010). Complete genome sequence of the thermophilic, obligately chemolithoautotrophic hydrogen-oxidizing bacterium *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *J Bacteriol* **192**, 2651-2652.

Bagchi, A. & Ghosh, T. C. (2011). Structural analyses of the interactions of SoxY and SoxZ from thermo-neutrophilic *Hydrogenobacter thermophilus*. *J Biophys Chem* **2**, 408-413.

Burggraf, S., Olsen, G. J., Stetter, K. O. & Woese, C. R. (1992). A Phylogenetic Analysis of *Aquifex pyrophilus*. *Syst Appl Microbiol* **15**, 352-356.

Chiba, Y., Horita, S., Ohtsuka, J., Arai, H., Nagata, K., Igarashi, Y., Tanokura, M. & Ishii, M. (2012a). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a novel type of phosphoserine phosphatase from *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **68**, 911-913.

Chiba, Y., Oshima, K., Arai, H., Ishii, M. & Igarashi, Y. (2012b). Discovery and analysis of cofactor-dependent phosphoglycerate mutase homologs as novel phosphoserine phosphatases in *Hydrogenobacter thermophilus*. *J Biol Chem* **287**, 11934-11941.

Chiba, Y., Terada, T., Kameya, M., Shimizu, K., Arai, H., Ishii, M. & Igarashi, Y. (2012c). Mechanism for folate-independent aldolase reaction catalyzed by serine hydroxymethyltransferase. *FEBS J* **279**, 504-514.

Chiba, Y., Horita, S., Ohtsuka, J., Arai, H., Nagata, K., Igarashi, Y., Tanokura, M. & Ishii, M. (2013). Structural units important for activity of a novel-type phosphoserine phosphatase from *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 revealed by crystal structure analysis. *J Biol Chem* **288**, 11448-11458.

Eck, R. V. & Dayhoff, M. O. (1966). Evolution of the structure of ferredoxin based on living relics of primitive amino acid sequences. *Science* **152**, 363-366.

Fuchs, G. (2011). Alternative pathways of carbon dioxide fixation: insights into the early evolution of life? *Annu Rev Microbiol* **65**, 631-658.

Giovannelli, D., Sievert, S. M., Hügler, M., Markert, S., Becher, D., Schweder, T. & Vetriani, C. (2017). Insight into the evolution of microbial metabolism from the deep-branching bacterium, *Thermovibrio ammonificans*. *eLife* **6**, e18990.

Gupta, R. S. & Lali, R. (2013). Molecular signatures for the phylum Aquificae and its different clades: proposal for division of the phylum Aquificae into the emended order *Aquificales*, containing the families *Aquificaceae* and *Hydrogenothermaceae*, and a new

order *Desulfurobacteriales* ord. nov., containing the family *Desulfurobacteriaceae*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **104**, 349-368.

Gupta, R. S. (2014). The Phylum Aquificae. In *The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea*, pp. 417-445. Edited by E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt & F. Thompson. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Hall, D. O., Cammack, R. & Rao, K. K. (1971). Role for ferredoxins in the origin of life and biological evolution. *Nature* **233**, 136-138.

Hasegawa, J., Yoshida, T., Yamazaki, T., Sambongi, Y., Yu, Y. H., Igarashi, Y., Kodama, T., Yamazaki, K., Kyogoku, Y. & Kobayashi, Y. (1998). Solution structure of thermostable cytochrome *c*₅₅₂ from *Hydrogenobacter thermophilus* determined by H-1-NMR spectroscopy. *Biochemistry* **37**, 9641-9649.

Hasegawa, J., Shimahara, H., Mizutani, M., Uchiyama, S., Arai, H., Ishii, M., Kobayashi, Y., Ferguson, S. J., Sambongi, Y. & Igarashi, Y. (1999). Stabilization of *Pseudomonas aeruginosa* cytochrome *c*₅₅₁ by systematic amino acid substitutions based on the structure of thermophilic *Hydrogenobacter thermophilus* cytochrome *c*₅₅₂. *J Biol Chem* **274**, 37533-37537.

Haufschildt, K., Schmelz, S., Kriegler, T. M., Neumann, A., Streif, J., Arai, H., Heinz, D. W. & Layer, G. (2014). The crystal structure of siroheme decarboxylase in complex with iron-uroporphyrin III reveals two essential histidine residues. *J Mol Biol* **426**, 3272-3286.

Igarashi, Y. & Kodama, T. (1990). *Hydrogenobacter thermophilus*: its unusual physiological properties and phylogenic position in the microbial world. *FEMS Microbiol Lett* **87**, 403-406.

Ikeda, T., Yamamoto, M., Arai, H., Ohmori, D., Ishii, M. & Igarashi, Y. (2005). Two tandemly arranged ferredoxin genes in the *Hydrogenobacter thermophilus* genome: Comparative characterization of the recombinant [4Fe-4S] ferredoxins. *Biosci Biotechnol Biochem* **69**, 1172-1177.

Ikeda, T., Ochiai, T., Morita, S., Nishiyama, A., Yamada, E., Arai, H., Ishii, M. & Igarashi, Y. (2006). Anabolic five subunit-type pyruvate : ferredoxin oxidoreductase from *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *Biochem Biophys Res Commun* **340**, 76-82.

Ikeda, T., Nakamura, M., Arai, H., Ishii, M. & Igarashi, Y. (2009). Ferredoxin-NADP reductase from the thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium, *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *FEMS Microbiol Lett*.

Ikeda, T., Yamamoto, M., Arai, H., Ohmori, D., Ishii, M. & Igarashi, Y. (2010). Enzymatic and electron paramagnetic resonance studies of anabolic pyruvate synthesis by pyruvate: ferredoxin oxidoreductase from *Hydrogenobacter thermophilus*. *FEBS J* **277**, 501-510.

Ishii, M., Igarashi, Y. & Kodama, T. (1987a). Purification and some properties of cytochrome *c*₅₅₂ from *Hydrogenobacter thermophilus*. *Agric Biol Chem* **51**, 1695-1696.

Ishii, M., Itoh, S., Kawasaki, H., Igarashi, Y. & Kodama, T. (1987b). The membrane-bound hydrogenase reduces cytochrome *c*₅₅₂ in *Hydrogenobacter thermophilus* strain TK-6. *Agric Biol Chem* **51**, 1825-1831.

- Ishii, M., Kawasumi, T., Igarashi, Y., Kodama, T. & Minoda, Y. (1987c).** 2-Methylthio-1,4-naphthoquinone, a unique sulfur-containing quinone from a thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium, *Hydrogenobacter thermophilus*. *J Bacteriol* **169**, 2380-2384.
- Ishii, M., Ueda, Y., Yoon, K. S., Igarashi, Y. & Kodama, T. (1996).** Purification and characterization of ferredoxin from *Hydrogenobacter thermophilus* strain TK-6. *Biosci Biotechnol Biochem* **60**, 1513-1515.
- Ishii, M., Takishita, S., Iwasaki, T., Peerapornpisal, Y., Yoshino, J., Kodama, T. & Igarashi, Y. (2000).** Purification and characterization of membrane-bound hydrogenase from *Hydrogenobacter thermophilus* strain TK-6, an obligately autotrophic, thermophilic, hydrogen-oxidizing bacterium. *Biosci Biotechnol Biochem* **64**, 492-502.
- Kameya, M., Arai, H., Ishii, M. & Igarashi, Y. (2006).** Purification and properties of glutamine synthetase from *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *J Biosci Bioeng* **102**, 311-315.
- Kameya, M., Ikeda, T., Nakamura, M., Arai, H., Ishii, M. & Igarashi, Y. (2007).** A novel ferredoxin-dependent glutamate synthase from the hydrogen-oxidizing chemoautotrophic bacterium *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *J Bacteriol* **189**, 2805-2812.
- Kameya, M., Arai, H., Ishii, M. & Igarashi, Y. (2010).** Purification of three aminotransferases from *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 – novel types of alanine or glycine aminotransferase. *FEBS J* **277**, 1876-1885.
- Kameya, M., Kanbe, H., Igarashi, Y., Arai, H. & Ishii, M. (2017).** Nitrate reductases in *Hydrogenobacter thermophilus* with evolutionarily ancient features: distinctive localization and electron transfer. *Mol Microbiol* **106**, 129-141.
- Kameya, M., Arai, H. & Ishii, M. (2020).** Importance of electron flow in microbiological metabolism. In *Electron-Based Bioscience and Biotechnology* pp. 13-32: Springer.
- Kawasumi, T., Igarashi, Y., Kodama, T. & Minoda, Y. (1980).** Isolation of strictly thermophilic and obligately autotrophic hydrogen bacteria. *Agric Biol Chem* **44**, 1985-1986.
- Kawasumi, T., Igarashi, Y., Kodama, T. & Minoda, Y. (1984).** *Hydrogenobacter thermophilus* gen. nov., sp. nov., an extremely thermophilic, aerobic, hydrogen-oxidizing bacterium. *Int J Syst Bacteriol* **34**, 5-10.
- Kim, K., Chiba, Y., Kobayashi, A., Arai, H. & Ishii, M. (2017).** Phosphoserine phosphatase is required for serine and one-carbon unit synthesis in *Hydrogenobacter thermophilus*. *J Bacteriol* **199**, e00409-00417.
- Kim, K. T., Chiba, Y., Arai, H. & Ishii, M. (2016).** Discovery of an intermolecular disulfide bond required for the thermostability of a heterodimeric protein from the thermophile *Hydrogenobacter thermophilus*. *Biosci Biotechnol Biochem* **80**, 232-240.
- Li, B. & Elliott, S. J. (2016).** The catalytic bias of 2-oxoacid:Ferredoxin oxidoreductase in CO₂: evolution and reduction through a ferredoxin-mediated electrocatalytic assay. *Electrochimica Acta* **199**, 349-356.

- Mall, A., Sobotta, J., Huber, C., Tschirner, C., Kowarschik, S., Bačnik, K., Mergelsberg, M., Boll, M., Hügler, M., Eisenreich, W. & Berg, I. A. (2018). Reversibility of citrate synthase allows autotrophic growth of a thermophilic bacterium. *Science* **359**, 563-567.
- Miura, A., Kameya, M., Arai, H., Ishii, M. & Igarashi, Y. (2008). A soluble NADH-dependent fumarate reductase in the reductive tricarboxylic acid cycle of *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *J Bacteriol* **190**, 7170-7177.
- Nishihara, A., Matsuura, K., Tank, M., McGlynn, S. E., Thiel, V. & Haruta, S. (2018a). Nitrogenase activity in thermophilic chemolithoautotrophic bacteria in the phylum *Aquificae* isolated under nitrogen-fixing conditions from Nakabusa Hot Springs. *Microbes Environ* **33**, 394-401.
- Nishihara, A., Thiel, V., Matsuura, K., McGlynn, S. E. & Haruta, S. (2018b). Phylogenetic diversity of nitrogenase reductase genes and possible nitrogen-fixing bacteria in thermophilic chemosynthetic microbial communities in Nakabusa Hot Springs. *Microbes Environ* **33**, 357-365.
- Nishihara, H., Igarashi, Y. & Kodama, T. (1990). A new isolate of *Hydrogenobacter*, an obligately chemolithoautotrophic, thermophilic, halophilic and aerobic hydrogen-oxidizing bacterium from seaside saline hot spring. *Arch Microbiol* **153**, 294-298.
- Nunoura, T., Chikaraishi, Y., Izaki, R., Suwa, T., Sato, T., Harada, T., Mori, K., Kato, Y., Miyazaki, M., Shimamura, S., Yanagawa, K., Shuto, A., Ohkouchi, N., Fujita, N., Takaki, Y., Atomi, H. & Takai, K. (2018). A primordial and reversible TCA cycle in a facultatively chemolithoautotrophic thermophile. *Science* **359**, 559-563.
- Oshima, K., Chiba, Y., Igarashi, Y., Arai, H. & Ishii, M. (2012). Phylogenetic position of aquificales based on the whole genome sequences of six aquificales species. *Int J Evol Biol* **2012**, 859264.
- Pitulle, C., Yang, Y., Marchiani, M., Moore, E. R., Siefert, J. L., Aragno, M., Jurtschuk, P., Jr. & Fox, G. E. (1994). Phylogenetic position of the genus *Hydrogenobacter*. *Int J Syst Bacteriol* **44**, 620-626.
- Reysenbach, A.-L. (2015). *Aquificae* phy. nov. In Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, pp. 1-1: John Wiley & Sons, Inc.
- Sanbongi, Y., Igarashi, Y. & Kodama, T. (1989a). Thermostability of cytochrome *c*-552 from the thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium *Hydrogenobacter thermophilus*. *Biochemistry* **28**, 9574-9578.
- Sanbongi, Y., Ishii, M., Igarashi, Y. & Kodama, T. (1989b). Amino acid sequence of cytochrome *c*-552 from a thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium, *Hydrogenobacter thermophilus*. *J Bacteriol* **171**, 65-69.
- Sano, R., Kameya, M., Wakai, S., Arai, H., Igarashi, Y., Ishii, M. & Sambongi, Y. (2010). Thiosulfate oxidation by a thermo-neutrophilic hydrogen-oxidizing bacterium, *Hydrogenobacter thermophilus*. *Biosci Biotechnol Biochem* **74**, 892-894.
- Sato, Y., Kameya, M., Fushinobu, S., Wakagi, T., Arai, H., Ishii, M. & Igarashi, Y. (2012a). A novel enzymatic system against oxidative stress in the thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium *Hydrogenobacter thermophilus*. *PLoS ONE* **7**, e34825.

- Sato, Y., Kanbe, H., Miyano, H., Sambongi, Y., Arai, H., Ishii, M. & Igarashi, Y. (2012b).** Transcriptome analyses of metabolic enzymes in thiosulfate- and hydrogen-grown *Hydrogenobacter thermophilus* cells. *Biosci Biotechnol Biochem* **76**, 1677-1681.
- Sato, Y., Arai, H., Igarashi, Y. & Ishii, M. (2014).** Adaptation of *Hydrogenobacter thermophilus* toward oxidative stress triggered by high expression of alkyl hydroperoxide reductase. *Biosci Biotechnol Biochem* **78**, 1619-1622.
- Shiba, H., Kawasumi, T., Igarashi, Y., Kodama, T. & Minoda, Y. (1984).** Effect of organic compounds on the growth of an obligately autotrophic hydrogen-oxidizing bacterium, *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *Agric Biol Chem* **48**, 2809-2813.
- Shiba, H., Kawasumi, T., Igarashi, Y., Kodama, T. & Minoda, Y. (1985).** The CO₂ assimilation via the reductive tricarboxylic-acid cycle in an obligately autotrophic, aerobic hydrogen-oxidizing bacterium, *Hydrogenobacter thermophilus*. *Arch Microbiol* **141**, 198-203.
- Shima, S. & Suzuki, K.-I. (1993).** *Hydrogenobacter acidophilus* sp. nov., a thermoacidophilic, aerobic, hydrogen-oxidizing bacterium requiring elemental sulfur for growth. *Int J Syst Evol Microbiol* **43**, 703-708.
- Suzuki, M., Cui, Z. J., Ishii, M. & Igarashi, Y. (2001).** Nitrate respiratory metabolism in an obligately autotrophic hydrogen-oxidizing bacterium, *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *Arch Microbiol* **175**, 75-78.
- Suzuki, M., Arai, H., Ishii, M. & Igarashi, Y. (2006a).** Gene structure and expression profile of cytochrome *bc* nitric oxide reductase from *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *Biosci Biotechnol Biochem* **70**, 1666-1671.
- Suzuki, M., Hirai, T., Arai, H., Ishii, M. & Igarashi, Y. (2006b).** Purification, characterization, and gene cloning of thermophilic cytochrome *cd*₁ nitrite reductase from *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *J Biosci Bioeng* **101**, 391-397.
- Takai, K., Komatsu, T. & Horikoshi, K. (2001).** *Hydrogenobacter subterraneus* sp. nov., an extremely thermophilic, heterotrophic bacterium unable to grow on hydrogen gas, from deep subsurface geothermal water. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 1425-1435.
- Travaglini-Allocatelli, C., Gianni, S., Dubey, V. K., Borgia, A., Di Matteo, A., Bonivento, D., Cutruzzolà, F., Bren, K. L. & Brunori, M. (2005).** An obligatory intermediate in the folding pathway of cytochrome *c*₅₅₂ from *Hydrogenobacter thermophilus*. *J Biol Chem* **280**, 25729-25734.
- Ueda, Y., Yamamoto, M., Urasaki, T., Arai, H., Ishii, M. & Igarashi, Y. (2007).** Sequencing and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of four hydrogenase gene clusters from an obligately autotrophic hydrogen-oxidizing bacterium, *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *J Biosci Bioeng* **104**, 470-475.
- Verschueren, K. H. G., Blanchet, C., Felix, J., Dansercoer, A., De Vos, D., Bloch, Y., Van Beeumen, J., Svergun, D., Gutsche, I., Savvides, S. N. & Verstraete, K. (2019).** Structure of ATP citrate lyase and the origin of citrate synthase in the Krebs cycle. *Nature* **568**, 571-575.
- Yoon, K. S., Ishii, M., Kodama, T. & Igarashi, Y. (1997).** Purification and characterization of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase

from *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *Arch Microbiol* **167**, 275-279.

Yoshino, J., Sugiyama, Y., Sakuda, S., Kodama, T., Nagasawa, H., Ishii, M. & Igarashi, Y. (2001). Chemical structure of a novel aminophospholipid from *Hydrogenobacter thermophilus* strain TK-6. *J Bacteriol* **183**, 6302-6304.

亀谷将史, 新井博之 & 石井正治 (2020). 水素細菌の代謝特性と低炭素社会実現に向けての展開. *極限環境生物学会誌* **18**, 30-38.

五十嵐泰夫 (1987). 水素細菌の機能とその利用. *日本農芸化学会誌* **61**, 1322-1325.

佐藤由也, 新井博之 & 石井正治 (2013). "電子の流れ"で代謝を読み解く : *Hydrogenobacter thermophilus* の新規 peroxidase の発見. *バイオサイエンスとインダストリー* **71**, 308-313.

西原宏史 (2001). 好気性水素酸化細菌の生態および進化系統と利用の可能性. *日本微生物生態学会誌* **16**, 32-39.

平野伸一 (2023). 水素細菌による CO₂からのバイオマス生産ポテンシャル. *生物工学会誌* **101**, 230-233.

10. 図表

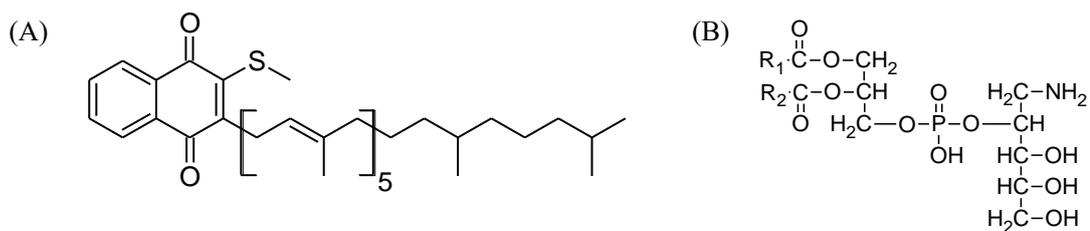


図 1. 本菌で見つかった新規菌体構成成分であるメチオナキノン (2-methylthio-1,4-naphthoquinone) (A)とアミノリン脂質(B)。

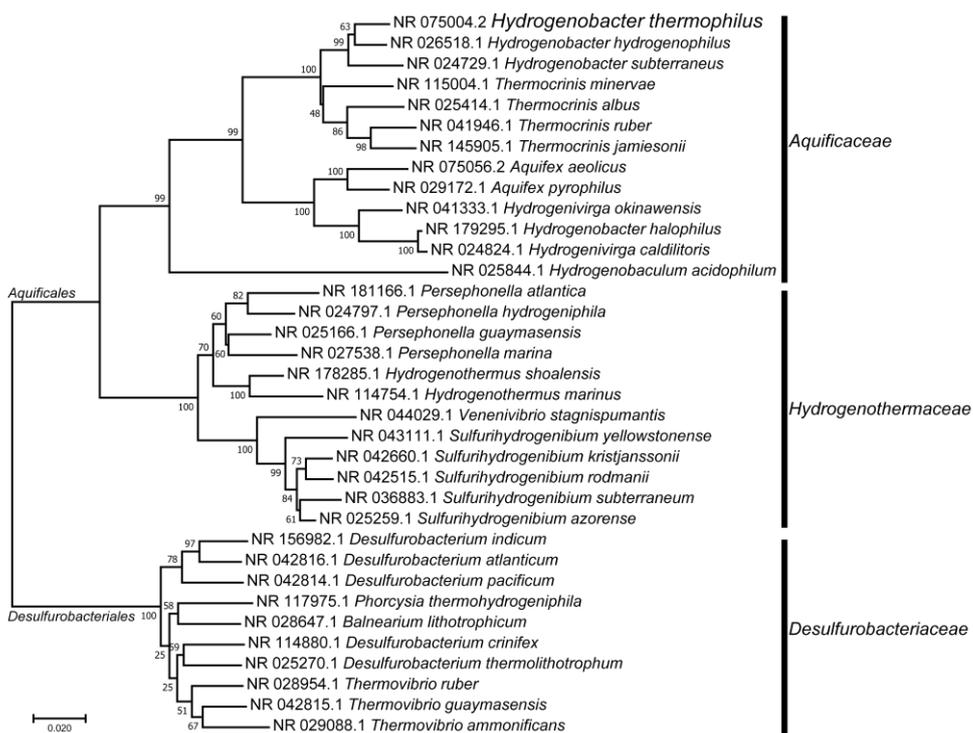


図 2. 16S rDNA 配列に基づく *Aquificota* 門細菌の系統樹。

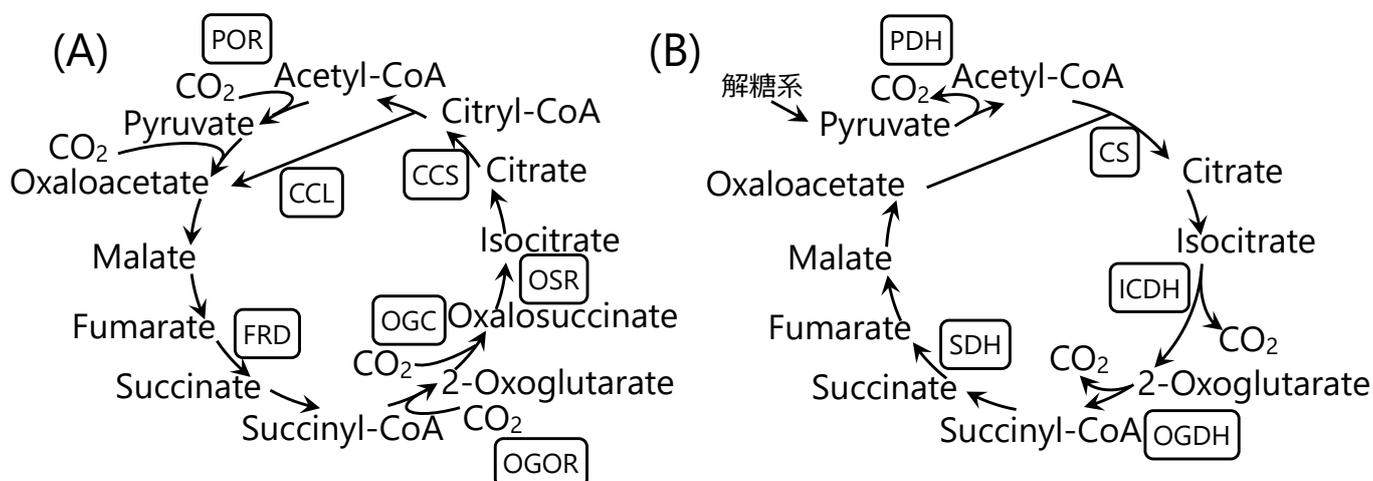


図 3. rTCA 回路と TCA 回路の比較。(A) *H. thermophilus* TK-6 の rTCA 回路。(B) 一般的な生物の TCA 回路。