

合成生物学による新規独立栄養生物・炭酸固定経路の創出

(書籍『独立栄養細菌による CO₂ 資源化技術』 第 I 編 総論 第 4 章)

亀谷将史 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
千葉洋子 理化学研究所環境資源科学研究センター、筑波大学生命環境系

1. はじめに

独立栄養生物としてこれまでに様々な生物種が得られているが、その炭酸固定能を物質生産などに産業利用するには大きく 2 つの課題と制約が残されている。

第一は、既存の独立栄養生物の生産性の低さである。従属栄養生物による物質生産では目的化合物に適した様々な生物種が利用され高い生産能を達成しているが、そうした「スペシャリスト」と言える株と同等の生産性を既存の独立栄養生物が示すことは稀である。独立栄養生物を改変し、代謝全体のバランスを大きく変えたりフラックスを増大させたりすることがもし自在にできるならば目的化合物の生産能を飛躍的に高めることも可能だが、こうした大規模な菌株改変は容易ではない。大腸菌などのモデル生物と比べ、独立栄養生物で利用可能な遺伝子改変技術しか使えないケースも多い(Claassens *et al.*, 2016)。そのため、「独立栄養生物の生産性を向上させる」という王道的なアプローチの他に、高い生産能を有する従属栄養性株に独立栄養的生育能を付与する試みが行われている。

第二は、既存の炭酸固定経路が応用上理想的な性能を必ずしも有しているわけではないことである。例えば一部の炭酸固定経路は酸素にきわめて弱い酵素を含むため、好気環境や好気性菌での利用が困難である。また、Calvin 回路やその鍵酵素 ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) は反応効率が低く、生産性のボトルネックとなることがしばしば指摘される。こうした欠点のない理想的な炭酸固定経路を設計し実用化することができれば、生産性の大幅な向上が期待される。

これら 2 つの課題を背景に本章では、合成生物学的手法に基づき、従属栄養生物に独立栄養的生育能を付与する研究、また非天然型の炭酸固定経路を設計し実際に構築する研究の近年の進展を紹介する。

2. 独立栄養生物の創出

2.1. 独立栄養生物創出の意義と必要条件

微生物の機能改変は古くから多くの試みがなされてきたが、その中でも“synthetic autotroph”の創出、すなわち従属栄養生物を独立栄養生物に改変することは、長年の大きな夢であり、産業的にも基礎科学的にも重要な目標とされてきた。もし有用微生物を独立栄養生物に改変できるなら、化石燃料ではなく CO₂ を原料とし、温室効果ガス削減に寄与するクリーンな物質生産が実現する。また、生物が独立栄養的に増殖するための条件や制約を理解することは、基礎科学的にも重要である。

ギ酸やメタノールは、CO₂ と同様に炭素原子 1 つからなる C₁ 化合物である。化学触媒により CO₂ との相互変換が容易であり、また液体での貯蔵や輸送が可能といった、CO₂ ともメタンや CO など他の C₁ 化合物とも異なる特長を有している(Kim *et al.*, 2020)。ギ酸またはメタノールのみを炭素源として生育する生物は多く知られている。これらはしばしば「メチロトロフ」として独立栄養生物とは別に扱われることもあるが、本章ではこれら CO₂ 以外の C₁ 化合物を唯一の炭素源として増殖する生物も「独立栄養生物」として扱う。

独立栄養生物として増殖するための必要条件として、まずは CO₂ など C₁ 化合物の固定能 (①) が挙げられる。しかし、これだけでは独立栄養生物として生育するのに不十分である。C₁ 固定には還元力とエネルギーが必要であり、一般的な従属栄養生物は有機物からこれらを獲得する。そのため従属栄養生物を有機物なしで独立栄養的に増殖可能にするためには、無機物または C₁ 化合物から 電子を得る能力 (②) および エネルギーを得る能力 (③) も新たに付与する必要がある。

2.2. CO₂ 資化能の付与

従属栄養生物への炭酸固定経路の導入はこれまで数多く試みられてきた（表 1）。RubisCO の導入は 2006 年以降大腸菌で行われ(Parikh *et al.*, 2006)、RubisCO と共に Calvin 回路を構成する酵素 phosphoribulokinase (Prk) も共発現させることで、有機物資化で生じた CO₂ の一部が同化されることが報告されている(Zhuang & Li, 2013)。さらに 2016 年には、こうした大腸菌株を後述するような実験室進化系に供することで、バイオマスの約 35% を CO₂ から合成可能な株の創出に成功している(Antonovsky *et al.*, 2016)。

Calvin 回路以外の炭酸固定経路が導入された例としては、*Chloroflexus aurantiacus* 由来 3-hydroxypropionate (3HP) cycle の一部を大腸菌に導入し、大腸菌内で機能することが検証されている(Mattozzi *et al.*, 2013)。また大腸菌以外を宿主とした研究として、従属栄養性の好熱性アーキア *Pyrococcus furiosus* に *Metallosphaera sedula* 由来 3HP/4-hydroxybutyrate (4HB) 回路の一部を導入することで、炭酸固定による 3-hydroxypropionate 生成に成功した例がある(Hawkins *et al.*, 2015; Keller *et al.*, 2013)。

これらの研究例では、炭酸固定経路の導入により代謝物またはバイオマスの一部が CO₂ から生成され、「CO₂ 資化能の付与」という点では期待された成果を挙げることに成功している。しかしいずれの例でも、無機物から電子やエネルギーを獲得する系（上記必要条件②と③）は導入されていないため、必然的にこれら改変株は独立栄養生物たり得ず、有機物を必要とする。

2.3. ギ酸やメタノールの資化能の付与

CO₂ だけでなく、ギ酸やメタノールといった C₁ 化合物についても資化経路が大腸菌に導入されている（図 2）。

還元的 Gly 経路は、初発反応で CO₂ をギ酸に還元し、さらにもう一分子の CO₂ を取り込む経路である（第 I 編第 1 章）。本経路を大腸菌に導入することで、バイオマスの一部が CO₂ やギ酸から合成されることが実証されている(Bang & Lee, 2018; Tashiro *et al.*, 2018; Yishai *et al.*, 2018)。

メタノール同化経路としては、セリン回路や ribulose monophosphate (RuMP) 回路、xylulose monophosphate (XuMP) 回路といった経路が知られている（図 1）。これら経路のうち、RuMP 回路を大腸菌に導入したときに、改変株がメタノールを炭素源として同化可能になることが報告されている(Müller *et al.*, 2015)。

従属栄養生物への C₁ 資化能の付与は、大腸菌以外の生物種でも試みられている。*Corynebacterium glutamicum* にメタノール資化経路を導入した例では、バイオマス炭素の最大 63% がメタノール由来となり、メタノールを主要な炭素源の一つとしたグルタミン酸生産に成功している(Tuyishime *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2020)。真核生物においても、*Saccharomyces cerevisiae* や *Yarrowia lipolytica* といった酵母でメタノール資化経路の導入あるいは増強が行われ、メタノールを同化可能な株が取得されている(Espinosa *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2021)。

代表的なメタノール資化菌である *Methylobacterium extorquens* は、メタノールを CO₂ へと酸化する過程で電子を得る経路と、メタノールを炭素源として同化するためのセリン回路を有しているが、炭酸固定能は有していない。この菌を親株として、メタノール酸化経路は残しつつもセリン回路を破壊し、さらに Calvin 回路を導入することで、メタノールの代わりに CO₂ を同化するようになることも報告されている(Schada von Borzyskowski *et al.*, 2018)。

これら人工的に創られたメタノール資化株の一部は、メタノールを CO₂ まで酸化する経路を有し、還元力をメタノール依存的に得ることができる（表 1）（図 2B）。すなわちこれらの株は、メタノール存在下で NADH 等の電子供与体および ATP を産生可能であり、上述の必要条件①～③を満たすことから、理論的には天然に存在するメチロトロフと同様にメタノールのみを炭素源として独立栄養的に増殖しておかしくはない。しかし実際にはいずれの株も、メタノールや CO₂ だけを炭素源とした条件で増殖せず、有機物が供給されてはじめて増殖可能となる。独立栄養生物として増殖するには、①～③は必要条件であるものの十分条件ではなく、次項「実験室進化実験と独立栄養生物創出」に詳述するようなさらなる条件が必要であることがこれらの研究から示唆されていた。

2.4. 実験室進化実験と独立栄養生物創出

C₁ 化合物を唯一の炭素源として生育する人工独立栄養生物の創出に最初に成功したのは、2019 年の研究である(Gleizer *et al.*, 2019)。本研究では、ギ酸を CO₂ に酸化する酵素 formate dehydrogenase (FDH) を大腸菌に導入することで、ギ酸依存的に電子およびエネルギーを得られるようにした (図 2A)。この株に Calvin 回路も導入した時点では、上述の人工メタノール資化株と同様に、炭酸固定は認められるものの独立栄養条件では増殖能を示さなかった。本研究で特筆すべき点は、この株を上述の論文(Antonovsky *et al.*, 2016)と類似した実験室進化系に供したことである。本進化系では、RubisCO 反応依存的にキシロースを資化するように菌株を改変した上で、まずキシロースを炭素源として連続培養し、RubisCO および周辺代謝が安定的に機能する順化株を取得する。続いて、徐々にキシロース量を制限し、従属栄養的な代謝フラックスから独立栄養的な代謝フラックスにシフトするような淘汰圧をかけることで、キシロースを必要とせずギ酸と CO₂ のみを炭素源として生育可能な順化株の取得に成功した。順化株には、Calvin 回路から代謝中間体の引き抜きに関与する酵素遺伝子などに変異が入っており、人工進化を通じて Calvin 回路周辺のフラックスが安定化されたこと、すなわち代謝フラックスが適正なバランスに調整されることが独立栄養生物として成立するためには重要であったことが示された。人工進化の過程についてはさらに詳細な解析が行われ、NADH/NAD 比を向上させる変異の重要性も示唆されている(Ben-Nissan *et al.*, 2023)。

上記の成功例はギ酸を電子・エネルギー源とする菌株によるものだが、ギ酸ではなくメタノールを用いる菌株でも同様の試みがなされている。RuMP 回路の酵素遺伝子を導入し実験室進化を行うことで、メタノールを唯一の炭素源として生育する大腸菌株の取得が 2020 年以降に相次いで報告されている(Chen *et al.*, 2020; Keller *et al.*, 2022)。また同時期に、RuMP 回路ではなく還元 Gly 経路を導入することでも、メタノールと CO₂ を炭素源として独立栄養的に生育する大腸菌株が構築されている(Kim *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2023)。

さらに、大腸菌以外の従属栄養生物の改変も近年報告されている(Gassler *et al.*, 2020)。本研究では、メタノール資化能を持つが CO₂ 固定能は有さない酵母 *Pichia pastoris* に、Calvin 回路遺伝子を導入している。この際、XuMP 経路を破壊しメタノール同化能を失わせるとともに、メタノール酸化能は残している。これにより、メタノールを電子源およびエネルギー源、CO₂ を唯一の炭素源として増殖する株が得られている。

これらいずれの研究でも、C₁ 代謝遺伝子の導入だけでは独立栄養条件で生育しない、もしくは増殖速度の遅い株しか得られておらず、実験室進化を行うことで増殖能の高い株の取得に成功している。初めて人工的な独立栄養生物の創出に成功した研究(Gleizer *et al.*, 2019)だけでなく、これらの研究例からも、独立栄養生物の創出にあたっては実験室進化による代謝バランスの調整が有効であることが支持される。

3. 非天然型炭酸固定経路の創出

3.1. 物質生産系としての炭酸固定経路の適性評価

CO₂ を原材料とした物質生産の実現に向けて、炭酸固定代謝の産業的利用が強く望まれている。前節「独立栄養生物の創出」のように炭酸固定能を付与した改変株を *in vivo* で利用する以外にも、必要な酵素群を調製して炭酸固定経路全体もしくは一部を *in vitro* で再構成して炭酸固定を行わせる、といった利用形態が考えられる。

このような炭酸固定代謝の利用に際しては、どの炭酸固定経路を使うかが最初の重要な選択となる。自然界には少なくとも 7 種類の炭酸固定経路が存在するが (第 I 編第 1 章)、その適否はどのように判断すべきか。使用形態 (*in vitro*・*in vivo*) や使用条件 (好気・嫌気など)、生産対象物質、生産性として重視する指標 (基質あたりの生成物回収率・反応速度・基質への親和性・系の頑強さなど) などによって評価軸は異なってくるが、一般的に以下のような経路の特性が考慮されることが多い。

1. エネルギー効率

ATP 消費量あたりの CO₂ 固定量は炭酸固定経路によって大きく異なる（表 2）。また、Calvin 回路の RubisCO は酸素存在下で非生産的な oxygenase 反応（光呼吸）を一定の割合で触媒してしまい、こうした基質選択性の低さに起因する副反応もエネルギー効率を低下させることが知られている。

2. 電子供与体

一般的な生体内電子伝達体である NADH・NADPH に加え、一部の炭酸固定経路はフェレドキシンも電子供与体として用いる（表 2）。フェレドキシンは酸化還元電位が低く、エネルギー的に不利な炭酸固定反応を駆動するのに重要であるが(Kameya *et al.*, 2020)、酸素存在下で自然酸化されるため、好気条件下での *in vitro* の使用や、一般的な好気性菌をホストとした *in vivo* の使用は難しいとされる（注）。また、物質生産ホストとして使われる多くの株はフェレドキシン還元系を有しておらず、*in vivo* での還元型フェレドキシン供給も課題となる。これに対し、NAD(P)H はほぼすべての生物種で供給可能であり、*in vitro* でも自動酸化をほとんど受けない。こうした理由から、NAD(P)H のみを電子供与体とする酵素・経路が検討対象となりやすい。

3. 酵素や中間代謝物の安定性

還元的 TCA 回路や Wood-Ljungdahl 経路などの一部の炭酸固定経路は、酸素感受性の極めて高い酵素を含む（表 2）ため、好気性菌への導入や好気環境下で使用が困難とされる（注）。また、経路中の代謝物の安定性も経路間で異なり、代謝物が不安定化する条件（高温環境や酸性・アルカリ性条件など）での使用も、反応速度や収率の低下の要因となる。

4. 酵素の触媒活性

炭酸固定速度や目的化合物生産速度の向上には、比活性や基質親和性が高い酵素の使用が有効である。経路を構成する酵素の中でも特に、エネルギー的に不利な反応を触媒する炭酸固定酵素は反応律速になりやすく、活性の高い炭酸固定酵素を選択することが重視される。また上述の光呼吸のように、基質選択性が低い酵素が含まれる場合、反応効率や収率が低下する。

5. 経路を構成する代謝物

物質生産を行うにあたっては、炭酸固定経路に加え、目的化合物の合成経路も導入する必要がある。炭酸固定経路中の代謝物を前駆体としてどれだけのステップ数で目的化合物を生成できるかにより、生産系構築の難度や生産性が変わってくる。すなわち、物質生産においては必ずしも唯一最適解となる炭酸固定経路があるわけではなく、目的化合物の前駆体供給に適した経路を選択するという戦略が有効となる。

（注）ただし、*Hydrogenobacter thermophilus* のように、好気性菌でありながらフェレドキシンを用い還元的 TCA 回路が機能する例も知られている(亀谷将史 *et al.*, 2023)。この菌のように細胞内を還元的に保てる菌であれば、好気性であってもフェレドキシンや酸素感受性の高い経路を使用できる可能性がある。

3.2. 非天然型炭酸固定経路の *in silico* 設計

上述のような観点から天然の炭酸固定経路には互いに長所や短所があり、生産効率や扱いやすさでいずれの経路も理想的とは言えない。天然経路で見られる弱点を克服した炭酸固定経路を実現するため、非天然型の炭酸固定経路として様々な代謝経路がこれまでに考案されている。

非天然型経路の設計を一口で言えば、「現実的に使用可能な酵素反応を組み合わせ、高性能と予想されるものを選別する」という作業になるが、何をもって「現実的に使用可能な酵素反応」とするか、またどのように性能を予想するかという戦略は様々である。例えばある論文(Bar-Even *et al.*, 2010)では、既知の酵素反応約 5,000 種類の組み合わせで成立する炭酸固定経路を独自のプログラムで網羅的に探索し、その中から熱力学的に進みうる経路を選抜している。これにより、わずか 4 酵素反応から成るシンプルな回路や、Malonyl-CoA–Oxaloacetate–Glyoxylate を中間代謝物とする MOG 回路などが設計されている。特に後者の経路は、高活性な PEP carboxylase

で炭酸固定を行うことから、その性能の高さも予想されている(Claassens, 2017)。こうした経路デザインはこの論文以外でも行われ、実際の使用を考え酸素耐性酵素の反応に限定するか、あるいは嫌氣的な使用を想定して酸素感受性酵素による反応も含めるか、また許容する酵素数の上限や性能予測ための計算方法をどう設定するかなどにより、様々な新規経路がこれまでに提案されている(Bar-Even *et al.*, 2012; Löwe & Kremling, 2021; Volpers *et al.*, 2016)。

3.3. 非天然型炭酸固定経路の in vitro 構築 : CETCH 回路

上述のようにこれまで様々な新規炭酸固定経路が提唱されてきたが、そのほとんどは in silico による予測にとどまる。その障壁となっているのは、実際に in vitro または in vivo で炭酸固定系を再構成して機能を実証すること、また系内で何らかの問題があったときにその原因を複雑な系内で特定し解消することの難しさである。こうした困難な作業を行い初めて in vitro で構築された経路が、CETCH (Crotonyl-CoA/ETHylmalonyl-CoA/Hydroxybutyryl-CoA) 回路である (図 3)。

CETCH 回路の構築(Schwander *et al.*, 2016)にあたってはまず、高い反応性と酸素耐性を備える enoyl-CoA reductase/carboxylase (ECR) が炭酸固定酵素として選定された。続いて、ECR の生成物から基質を再生するような回路状の経路が設計された。こうした設計において、従来の研究では既知の酵素反応のみを反応候補として用いてきたのに対し、本研究では、天然では知られていない反応であっても類似反応を触媒する酵素が知られていれば採用している。これにより、先行研究では候補となりえなかった経路も検討対象となり、CETCH 回路を含む複数の有望な候補経路を得ている。これら経路に対し、熱力学的に無理のない反応で構成されているか、また各反応ステップを触媒する酵素が得られそうかを検討し、CETCH 回路が最終的に候補として絞り込まれた。

次に、設計された CETCH 回路の各反応を触媒する酵素を取得し、全酵素を in vitro で共役させて回路として機能するかを検証している。想定通り機能しない場合はその原因を特定し設計の修正を繰り返し、例えば当初使用するはずだった methylsuccinyl-CoA dehydrogenase に問題が見つかったため、酵素工学的にこの脱水素酵素 (dehydrogenase) を酸化酵素 (oxidase) へと作り替えるなどの対応を取っている。その他にも様々な修正を加えることで、CO₂ 取り込み速度 5 nmol min⁻¹ mg⁻¹ protein で炭酸固定経路として機能する in vitro 系の構築に成功している(Schwander *et al.*, 2016)。

構築された CETCH 回路は様々な形で利用されている。人工的な疑似葉緑体の構築を目指した研究では、葉緑体のチラコイド膜を細胞サイズのドロプレット (液滴) に封入することで光依存的に ATP と NADPH を再生する系を作製し、そこに CETCH 回路を加えると炭酸固定が進むことを実証している(Miller *et al.*, 2020)。また、当初 CETCH 回路の生成物は glyoxylate だけであった (図 3) が、各種代謝経路と共役させることにより oxaloacetate や malate、acetyl-CoA も生成可能になり、有価物であるテルペンやポリケタイドの合成に成功している(Sundaram *et al.*, 2021)。さらに、CETCH 回路の補充経路 (anaplerotic pathway) を導入することで、CETCH 回路中の代謝物を前駆体とした物質生産も可能となっている(Diehl *et al.*, 2023)。

3.4. その他の炭酸固定経路の構築

CETCH 回路以降も、非天然型炭酸固定経路の in vitro 構築の成功は続いている。2022 年に報告された経路は、rGPS (reductive Glyoxylate and Pyruvate Synthesis) cycle と MCG (Malyl-CoA-Glycerate) pathway の 2 つのモジュールから成り、rGPS-MCG 回路と呼ばれる(Luo *et al.*, 2022)。本研究で特筆すべきは、opto-sensing modules を使用することで系内の NAD(P)H や ATP の濃度を常時モニタリングし、その減少量に応じて再生系を添加していることである。これにより系の生産性が維持され、反応開始 6 時間目までで 28.5 nmol min⁻¹ mg⁻¹ protein、反応開始 1.5 時間に限れば 100 nmol min⁻¹ mg⁻¹ protein という、CETCH 回路を大幅に上回る炭酸固定能を達成している。

CETCH 回路や rGPS-MCG 回路は 10 を超える多数の酵素から構成されるが、もっとシンプルな構成の非天然型炭酸固定経路も構築されている。POAP 回路は Pyruvate carboxylase, Oxaloacetate acetylhydrolase, Acetate-CoA ligase,

Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase の 4 酵素のみから成り、炭酸固定酵素 1 mg あたり 8.0 nmol min⁻¹ という炭酸固定能を単純な回路構成で達成している(Xiao *et al.*, 2022)。

上述のような回路状ではない経路も構築されている。Artificial Starch Anabolic Pathway、ASAP と名付けられた人工経路は、無機触媒による CO₂ 還元で生成するメタノールを出発物質とし、C3 や C6 の糖類を生成し、さらにはデンプンへと変換する(Cai *et al.*, 2021)。このような直鎖状の経路により、触媒 1 mg あたり 22 nmol min⁻¹ という高い炭酸固定能でのデンプン生成に成功している。

in vitro での炭酸固定経路の構築が近年大きく進展した一方で、こうした経路を生体内に導入し in vivo で機能させることには現時点で成功していない。優れた生産性を示す非天然型炭酸固定経路を、前節「独立栄養生物の創出」のように様々な生物に付与し利用することは、今後の課題となっている。

4. 終わりに

合成生物学の発展により、デザインした代謝系を実際に in vivo, in vitro で構築することが可能となった。しかし現状では、目的の機能を有する酵素をゼロから作ることにはほぼ不可能であり、既存の酵素そのものもしくはそれを改変した酵素を用いる必要がある。さらに、現存生物への C₁ 固定代謝経路の導入および独立栄養生物化には、CETCH 回路のような非天然型代謝経路も理論的に利用可能であるものの、これまでの成功例は天然に存在する代謝経路もしくはその一部を導入したものに限られる。天然に存在する C₁ 固定代謝経路およびそれに関連する酵素は合成生物学の原資であり、新たな代謝経路や酵素の発見は炭酸固定の合成生物学の飛躍的な進歩に貢献するだろう。

一方で、合成生物学が基礎科学の進歩に寄与することもある。例えば、合成生物学的な代謝導入および実験室進化が行なわれたことにより、ある代謝経路が細胞内でスムーズに機能するためには周辺代謝とのバランスが重要であることが実証された(本章 2.4)。今後研究の進展により、理想的な代謝バランスとは具体的に何なのか、またその一般法則が明らかになれば、これは応用科学だけでなく基礎科学にも大きな進展をもたらす。また、還元的 Gly 経路の反応自体は 1980 年ごろから知られていたが、現実的な炭酸固定経路としては長年認識されてこなかった。しかし合成生物学において本経路が有望な炭酸固定経路として提唱される(Cotton *et al.* 2018)のときを共にして、自然界でも本経路が独立栄養生物の炭酸固定経路として機能していることがゲノム情報から推定され(Figueroa *et al.*, 2018)、その後実証された(Sánchez-Andrea *et al.*, 2020; Song *et al.*, 2020)。

このように自然界の代謝理解と炭酸固定の合成生物学の進展は独立したものではなく、鳥の両翼のような関係にある。本書籍で紹介される様々な独立栄養生物の多彩な代謝機能が合成生物学分野で今後ますます活用されること、またそうした研究を通じて代謝機能の理解がさらに深まることを期待したい。

5. 引用文献

Antonovsky, N., Gleizer, S., Noor, E., Zohar, Y., Herz, E., Barenholz, U., Zelcbuch, L., Amram, S., Wides, A., Tepper, N., Davidi, D., Bar-On, Y., Bareia, T., Wernick, David G., Shani, I., Malitsky, S., Jona, G., Bar-Even, A. & Milo, R. (2016). Sugar Synthesis from CO₂ in *Escherichia coli*. *Cell* **166**, 115-125.

Bang, J. & Lee, S. Y. (2018). Assimilation of formic acid and CO₂ by engineered *Escherichia coli* equipped with reconstructed one-carbon assimilation pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, E9271-E9279.

Bar-Even, A., Noor, E., Lewis, N. E. & Milo, R. (2010). Design and analysis of synthetic carbon fixation pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 8889-8894.

Bar-Even, A., Noor, E. & Milo, R. (2012). A survey of carbon fixation pathways through a quantitative lens. *J Exp Bot* **63**, 2325-

Ben-Nissan, R., Milshtein, E., Pahl, V., de Pins, B., Jona, G., Levi, D., Yung, H., Nir, N., Ezra, D., Gleizer, S., Link, H., Noor, E. & Milo, R. (2023). Autotrophic growth of *E. coli* is achieved by a small number of genetic changes. *eLife* **12**, RP88793.

Bierbaumer, S., Nattermann, M., Schulz, L., Zschoche, R., Erb, T. J., Winkler, C. K., Tinzl, M. & Glueck, S. M. (2023). Enzymatic Conversion of CO₂: From Natural to Artificial Utilization. *Chemical Reviews* **123**, 5702-5754.

Cai, T., Sun, H., Qiao, J., Zhu, L., Zhang, F., Zhang, J., Tang, Z., Wei, X., Yang, J., Yuan, Q., Wang, W., Yang, X., Chu, H., Wang, Q., You, C., Ma, H., Sun, Y., Li, Y., Li, C., Jiang, H., Wang, Q. & Ma, Y. (2021). Cell-free chemoenzymatic starch synthesis from carbon dioxide. *Science* **373**, 1523-1527.

Caspi, R., Billington, R., Fulcher, C. A., Keseler, I. M., Kothari, A., Krummenacker, M., Latendresse, M., Midford, P. E., Ong, Q., Ong, W. K., Paley, S., Subhraveti, P. & Karp, P. D. (2017). The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes. *Nucleic Acids Res* **46**, D633-D639.

Chen, F. Y. H., Jung, H.-W., Tsuei, C.-Y. & Liao, J. C. (2020). Converting *Escherichia coli* to a Synthetic Methylophile Growing Solely on Methanol. *Cell* **182**, 933-946.e914.

Claassens, N. J., Sousa, D. Z., Dos Santos, V. A., de Vos, W. M. & van der Oost, J. (2016). Harnessing the power of microbial autotrophy. *Nat Rev Microbiol* **14**, 692-706.

Claassens, N. J. (2017). A warm welcome for alternative CO₂ fixation pathways in microbial biotechnology. *Microb Biotechnol* **10**, 31-34.

Diehl, C., Gerlinger, P. D., Paczia, N. & Erb, T. J. (2023). Synthetic anaplerotic modules for the direct synthesis of complex molecules from CO₂. *Nat Chem Biol* **19**, 168-175.

Espinosa, M. I., Gonzalez-Garcia, R. A., Valgepea, K., Plan, M. R., Scott, C., Pretorius, I. S., Marcellin, E., Paulsen, I. T. & Williams, T. C. (2020). Adaptive laboratory evolution of native methanol assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Commun* **11**, 5564.

Figuerola, I. A., Barnum, T. P., Somasekhar, P. Y., Carlström, C. I., Engelbrektson, A. L. & Coates, J. D. (2018). Metagenomics-guided analysis of microbial chemolithoautotrophic phosphite oxidation yields evidence of a seventh natural CO₂ fixation pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **115**, E92-E101.

Gassler, T., Sauer, M., Gasser, B., Egermeier, M., Troyer, C., Causon, T., Hann, S., Mattanovich, D. & Steiger, M. G. (2020). The industrial yeast *Pichia pastoris* is converted from a heterotroph into an autotroph capable of growth on CO₂. *Nat Biotechnol* **38**, 210-216.

Gleizer, S., Ben-Nissan, R., Bar-On, Y. M., Antonovsky, N., Noor, E., Zohar, Y., Jona, G., Krieger, E., Shamshoum, M., Bar-Even, A. & Milo, R. (2019). Conversion of *Escherichia coli* to generate all biomass carbon from CO₂. *Cell* **179**, 1255-1263 e1212.

- Hawkins, A. B., Lian, H., Zeldes, B. M., Loder, A. J., Lipscomb, G. L., Schut, G. J., Keller, M. W., Adams, M. W. W. & Kelly, R. M. (2015). Bioprocessing analysis of *Pyrococcus furiosus* strains engineered for CO₂-based 3-hydroxypropionate production. *Biotechnol Bioeng* **112**, 1533-1543.
- Kameya, M., Arai, H. & Ishii, M. (2020). Importance of electron flow in microbiological metabolism. In *Electron-Based Bioscience and Biotechnology* pp. 13-32: Springer.
- Keller, M. W., Schut, G. J., Lipscomb, G. L., Menon, A. L., Iwuchukwu, I. J., Leuko, T. T., Thorgersen, M. P., Nixon, W. J., Hawkins, A. S., Kelly, R. M. & Adams, M. W. W. (2013). Exploiting microbial hyperthermophilicity to produce an industrial chemical, using hydrogen and carbon dioxide. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 5840-5845.
- Keller, P., Reiter, M. A., Kiefer, P., Gassler, T., Hemmerle, L., Christen, P., Noor, E. & Vorholt, J. A. (2022). Generation of an *Escherichia coli* strain growing on methanol via the ribulose monophosphate cycle. *Nat Commun* **13**, 5243.
- Kim, S., Lindner, S. N., Aslan, S., Yishai, O., Wenk, S., Schann, K. & Bar-Even, A. (2020). Growth of *E. coli* on formate and methanol via the reductive glycine pathway. *Nat Chem Biol* **16**, 538-545.
- Kim, S., Giraldo, N., Rainaldi, V., Machens, F., Collas, F., Kubis, A., Kensy, F., Bar-Even, A. & Lindner, S. N. (2023). Optimizing *E. coli* as a formatotrophic platform for bioproduction via the reductive glycine pathway. *Front Bioeng Biotechnol* **11**, 1091899.
- Löwe, H. & Kremling, A. (2021). In-Depth Computational Analysis of Natural and Artificial Carbon Fixation Pathways. *BioDesign Research* **2021**, 9898316.
- Luo, S., Lin, P. P., Nieh, L.-Y., Liao, G.-B., Tang, P.-W., Chen, C. & Liao, J. C. (2022). A cell-free self-replenishing CO₂-fixing system. *Nat Catal* **5**, 154-162.
- Müller, J. E. N., Meyer, F., Litsanov, B., Kiefer, P., Potthoff, E., Heux, S., Quax, W. J., Wendisch, V. F., Brautaset, T., Portais, J.-C. & Vorholt, J. A. (2015). Engineering *Escherichia coli* for methanol conversion. *Metab Eng* **28**, 190-201.
- 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.
- Mattozzi, M. d., Ziesack, M., Voges, M. J., Silver, P. A. & Way, J. C. (2013). Expression of the sub-pathways of the *Chloroflexus aurantiacus* 3-hydroxypropionate carbon fixation bicycle in *E. coli*: Toward horizontal transfer of autotrophic growth. *Metab Eng* **16**, 130-139.
- Miller, T. E., Beneyton, T., Schwander, T., Diehl, C., Girault, M., McLean, R., Chotel, T., Claus, P., Cortina, N. S., Baret, J.-C. & Erb, T. J. (2020). Light-powered CO₂ fixation in a chloroplast mimic with natural and synthetic parts. *Science* **368**, 649-654.

- Parikh, M. R., Greene, D. N., Woods, K. K. & Matsumura, I. (2006).** Directed evolution of RuBisCO hypermorphs through genetic selection in engineered *E.coli*. *Protein Eng Des Sel* **19**, 113-119.
- Sánchez-Andrea, I., Guedes, I. A., Hornung, B., Boeren, S., Lawson, C. E., Sousa, D. Z., Bar-Even, A., Claassens, N. J. & Stams, A. J. M. (2020).** The reductive glycine pathway allows autotrophic growth of *Desulfovibrio desulfuricans*. *Nat Commun* **11**, 5090.
- Schada von Borzyskowski, L., Carrillo, M., Leupold, S., Glatter, T., Kiefer, P., Weishaupt, R., Heinemann, M. & Erb, T. J. (2018).** An engineered Calvin-Benson-Bassham cycle for carbon dioxide fixation in *Methylobacterium extorquens* AM1. *Metab Eng* **47**, 423-433.
- Schwander, T., Schada von Borzyskowski, L., Burgener, S., Cortina, N. S. & Erb, T. J. (2016).** A synthetic pathway for the fixation of carbon dioxide in vitro. *Science* **354**, 900-904.
- Song, Y., Lee, J. S., Shin, J., Lee, G. M., Jin, S., Kang, S., Lee, J.-K., Kim, D. R., Lee, E. Y., Kim, S. C., Cho, S., Kim, D. & Cho, B.-K. (2020).** Functional cooperation of the glycine synthase-reductase and Wood–Ljungdahl pathways for autotrophic growth of *Clostridium drakei*. *Proc Natl Acad Sci USA* **117**, 7516-7523.
- Sundaram, S., Diehl, C., Cortina, N. S., Bamberger, J., Paczia, N. & Erb, T. J. (2021).** A Modular In Vitro Platform for the Production of Terpenes and Polyketides from CO₂. *Angew Chem* **60**, 16420-16425.
- Tashiro, Y., Hirano, S., Matson, M. M., Atsumi, S. & Kondo, A. (2018).** Electrical-biological hybrid system for CO₂ reduction. *Metab Eng* **47**, 211-218.
- Tuyishime, P., Wang, Y., Fan, L., Zhang, Q., Li, Q., Zheng, P., Sun, J. & Ma, Y. (2018).** Engineering *Corynebacterium glutamicum* for methanol-dependent growth and glutamate production. *Metab Eng* **49**, 220-231.
- Volpers, M., Claassens, N. J., Noor, E., van der Oost, J., de Vos, W. M., Kengen, S. W. M. & Martins dos Santos, V. A. P. (2016).** Integrated In Silico Analysis of Pathway Designs for Synthetic Photo-Electro-Autotrophy. *PLOS ONE* **11**, e0157851.
- Wang, G., Olofsson-Dolk, M., Hansson, F. G., Donati, S., Li, X., Chang, H., Cheng, J., Dahlin, J. & Borodina, I. (2021).** Engineering Yeast *Yarrowia lipolytica* for Methanol Assimilation. *ACS Synth Biol* **10**, 3537-3550.
- Wang, Y., Fan, L., Tuyishime, P., Liu, J., Zhang, K., Gao, N., Zhang, Z., Ni, X., Feng, J., Yuan, Q., Ma, H., Zheng, P., Sun, J. & Ma, Y. (2020).** Adaptive laboratory evolution enhances methanol tolerance and conversion in engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Communications Biology* **3**, 217.
- Xiao, L., Liu, G., Gong, F., Zhu, H., Zhang, Y., Cai, Z. & Li, Y. (2022).** A Minimized Synthetic Carbon Fixation Cycle. *ACS Catalysis* **12**, 799-808.
- Yishai, O., Bouzon, M., Doring, V. & Bar-Even, A. (2018).** In vivo assimilation of one-carbon via a synthetic reductive glycine pathway in *Escherichia coli*. *ACS Synth Biol* **7**, 2023-2028.

Zhang, W., Zhang, T., Wu, S., Wu, M., Xin, F., Dong, W., Ma, J., Zhang, M. & Jiang, M. (2017). Guidance for engineering of synthetic methylotrophy based on methanol metabolism in methylotrophy. *RSC Advances* **7**, 4083-4091.

Zhuang, Z.-Y. & Li, S.-Y. (2013). Rubisco-based engineered *Escherichia coli* for in situ carbon dioxide recycling. *Bioresour Technol* **150**, 79-88.

亀谷将史, 新井博之 & 石井正治 (2023). 極限環境から分離された好熱性水素細菌の代謝解析. In 極限環境微生物の先端科学と社会実装最前線, pp. in press: エヌ・ティー・エス.

6. 図表

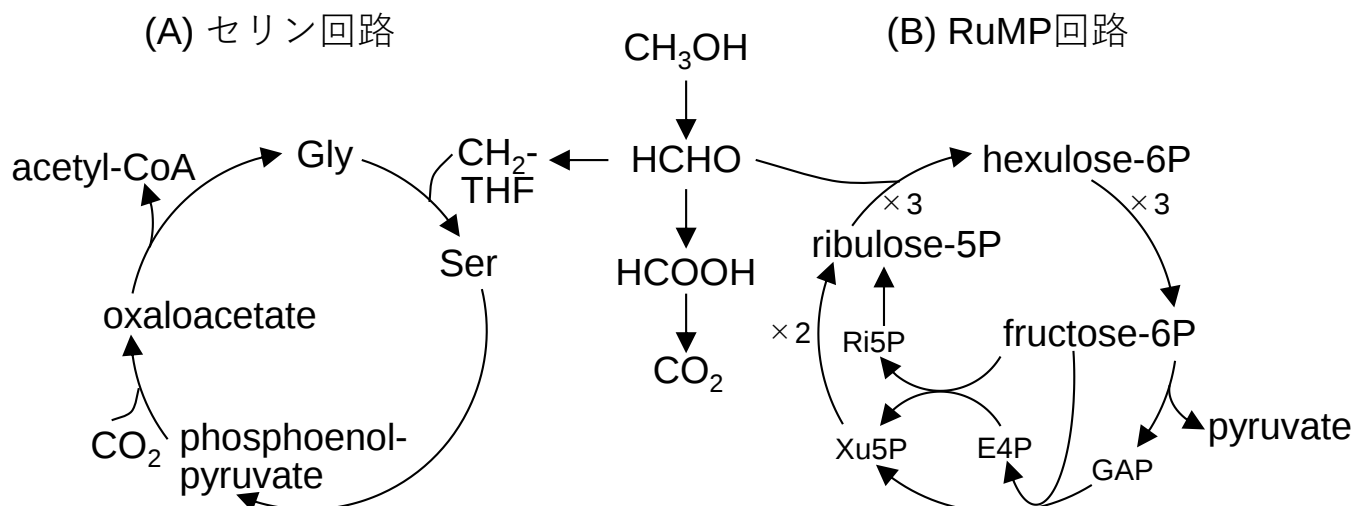


図 1. メタノール同化代謝経路の模式図(Zhang *et al.*, 2017)。バクテリアで代表的な経路である (A) セリン回路と (B) RuMP 回路を示す。一部の反応中間体は省略し、複数の酵素反応を 1 本の矢印でまとめて表記している。RuMP 回路は生物種ごとに違いがあり、その一種(Caspi *et al.*, 2017)を示している。これら経路以外にも、酵母などでは XuMP 回路と呼ばれるメタノール同化代謝経路も知られる。E4P, erythrose-4-phosphate; GAP, glyceraldehyde 3-phosphate; Ri5P, ribose 5-phosphate; THF, tetrahydrofolate; Xu5P, xylulose 5-phosphate。

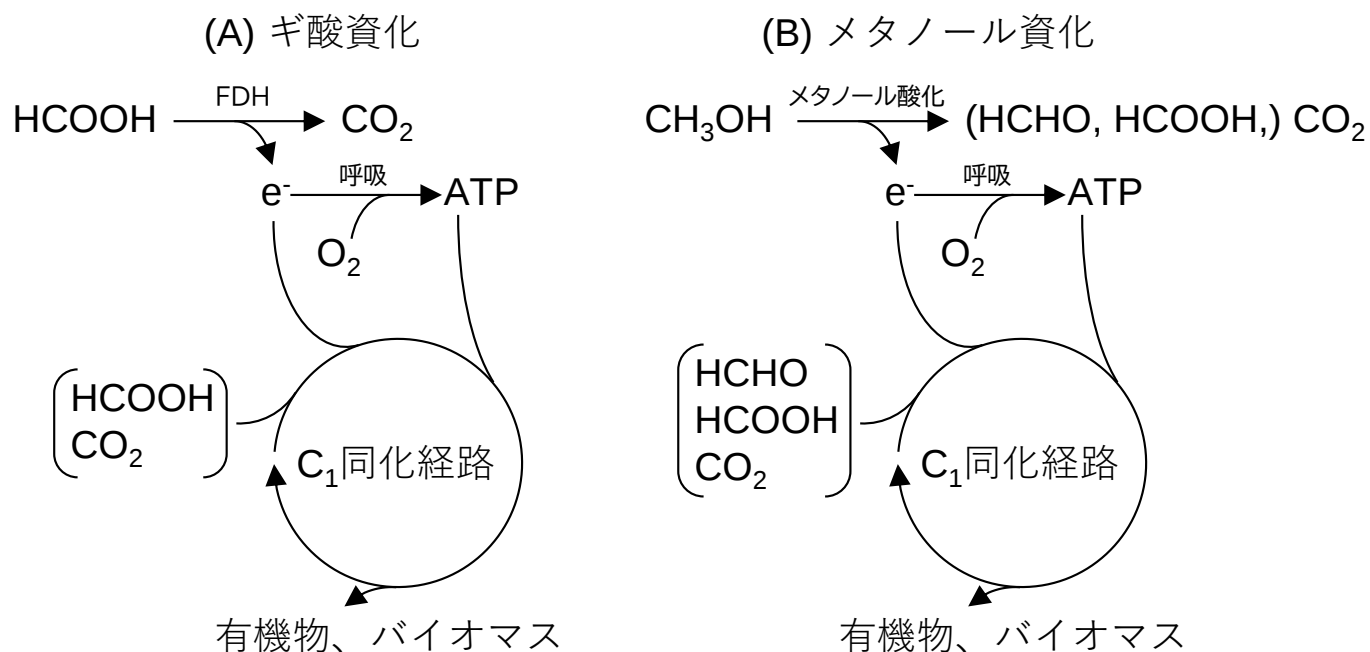


図 2. 本章で紹介したギ酸・メタノール資化能付与株の代謝の模式図。(A)ギ酸資化株は、FDH によりギ酸を CO_2 へと酸化することで電子およびエネルギーを得る。生成した CO_2 を炭酸固定経路で取り込む、あるいは直接ギ酸を還元的 Gly 経路で取り込むことで炭素源とする。(B)メタノール資化株は、メタノールを CO_2 あるいはその中間体であるホルムアルデヒドやギ酸 (図 1) へと酸化することで電子およびエネルギーを得る。 CO_2 やギ酸は(A)と同様の経路で、ホルムアルデヒドは RuMP 回路やセリン回路 (図 1) で取り込むことで炭素源とする。

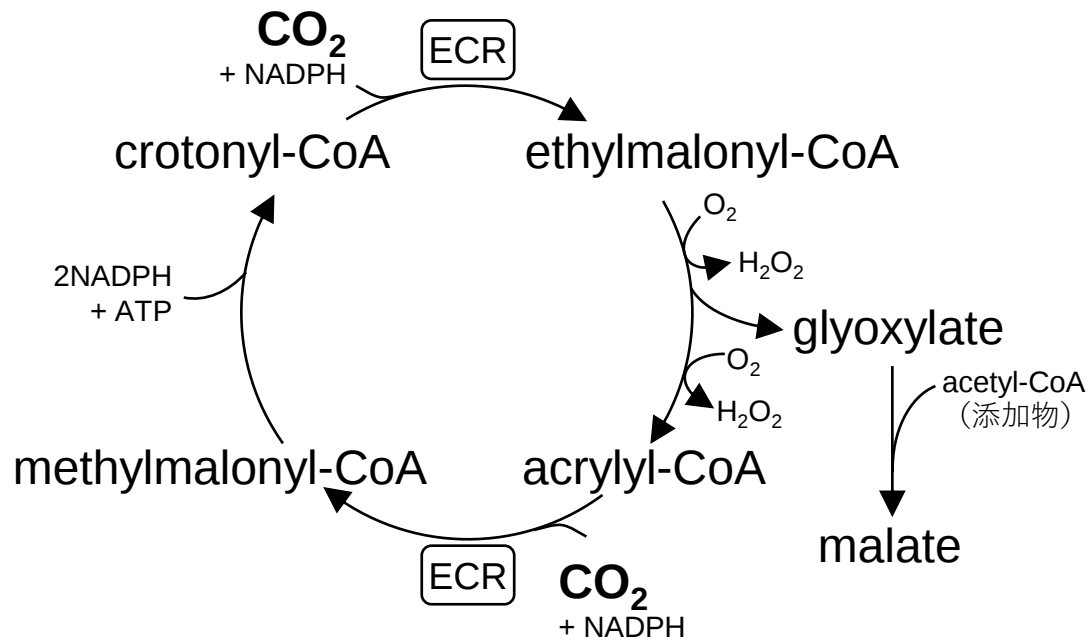


図 3. CETCH 回路 (version 5.4) の模式図(Schwander *et al.*, 2016)。実際の回路は 12 ステップの酵素反応から成るが、簡便のため反応中間体の多くを省略し、複数の酵素反応を 1 本の矢印でまとめて表記している。回路中 2 箇所¹の炭酸固定反応はいずれも、ECR ファミリーに属する単一の酵素によって触媒される。Acetyl-CoA は炭酸固定由来ではなく、glyoxylate 除去のために系外から添加しているため、malate は純粋な炭酸固定産物ではない。

表 1. 本章で紹介する、微生物改変による CO₂・C₁ 資化能付与

ホスト	C ₁ 固定経路	利用可能な C ₁ 化合物	独立栄養的増殖	C ₁ 化合物による電子・エネルギー獲得	文献
大腸菌	Calvin 回路	CO ₂	不可	不可	(Antonovsky <i>et al.</i> , 2016)
大腸菌	3HP 回路の一部	CO ₂	不可	不可	(Mattozzi <i>et al.</i> , 2013)
<i>P. furiosus</i>	3HP/4HB 回路の一部	CO ₂	不可	不可	(Hawkins <i>et al.</i> , 2015; Keller <i>et al.</i> , 2013)
大腸菌	還元的 Gly 経路	ギ酸、CO ₂	不可	ギ酸酸化	(Bang & Lee, 2018; Tashiro <i>et al.</i> , 2018; Yishai <i>et al.</i> , 2018)
大腸菌	RuMP 回路	メタノール	不可	メタノール酸化	(Müller <i>et al.</i> , 2015)
<i>C. glutamicum</i>	RuMP 回路	メタノール	不可	メタノール同化産物の酸化 (TCA 回路)	(Tuyishime <i>et al.</i> , 2018; Wang <i>et al.</i> , 2020)
<i>S. cerevisiae</i> , <i>Y. lipolytica</i>	XuMP 回路 (もしくは類似経路)	メタノール	不可	メタノール酸化	(Espinosa <i>et al.</i> , 2020; Wang <i>et al.</i> , 2021)
<i>M. extorquens</i>	Calvin 回路 (メタノール同化経路は破壊)	CO ₂ 、 メタノール ^a	不可	メタノール酸化	(Schada von Borzyskowski <i>et al.</i> , 2018)
大腸菌	Calvin 回路、FDH	ギ酸、CO ₂	可	ギ酸酸化	(Gleizer <i>et al.</i> , 2019)
大腸菌	RuMP 回路	メタノール	可	メタノール同化産物の酸化 (TCA 回路)	(Chen <i>et al.</i> , 2020; Keller <i>et al.</i> , 2022)
大腸菌	還元的 Gly 経路、 メタノールからギ酸への酸化	ギ酸、CO ₂ 、 メタノール	可	メタノール酸化	(Kim <i>et al.</i> , 2020; Kim <i>et al.</i> , 2023)
<i>P. pastoris</i>	Calvin 回路 (メタノール同化経路は破壊)	CO ₂ 、 メタノール	可	メタノール酸化	(Gassler <i>et al.</i> , 2020)

a メタノールは電子・エネルギー源としては資化できるが、炭素源としては同化できない。

表 2. 天然に存在する炭酸固定経路の比較

炭酸固定経路 ^a	ATP 消費 ^b	電子供与体 ^c	酸素感受性酵素	その他
Calvin 回路	7	NAD(P)H	なし	好気条件で oxygenase 反応が起きる
還元的 TCA 回路	1~3	NAD(P)H、Fd	あり	
WL 経路	0 ^c	NAD(P)H、Fd	あり	
3HP 回路	7 ^d	NAD(P)H	なし	
DC/4HB 回路	5	NAD(P)H、Fd	あり	
3HP/4HB 回路	4~6	NAD(P)H	なし	
還元的 Gly 経路	2	NAD(P)H ^f	なし ^f	高濃度の CO ₂ を要する

各経路の詳細は第 I 編第 1 章図 1 を参照のこと。

a WL, Wood-Ljungdahl; 3HP, 3-hydroxypropionate; DC/4HB, dicarboxylate/4-hydroxybutyrate; 3HP/4HB, 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate

b Acetyl-CoA 1 分子を生成するのに消費される ATP 分子数を示す(Bierbaumer *et al.*, 2023; Mall *et al.*, 2018)。

c 炭酸固定に共役したプロトン排出による ATP 生成を考慮した。

d ATP の AMP への加水分解は、ATP 2 分子の消費と換算した。

e Fd, フェレドキシン。

f Gly から acetyl-CoA を経由して pyruvate を合成する場合は Fd やチオレドキシン、酸素感受性酵素が関与するが、Ser を前駆体として pyruvate 合成する場合にはこれら電子供与体や酸素感受性酵素は関与しない。